Untersuchungen an Stanniusschen Körperchen des Flussaales

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Georg-August-Universität

zu Göttingen

vorgelegt von

Hansjürgen Ristow

aus Berlin

Göttingen 1964

Untersuchungen
an
Stanniusschen Körperchen des Flussaales

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Georg - August - Universität
zu Göttingen

vorgelegt von
Hansjürgen Ristow
aus Berlin

Göttingen 1964

D 7

Referent: Professor Dr. H. P i e p h o
Korreferent: Professor Dr. G. B i r u k o w

Tag der mündlichen Prüfung: 15.Mai 1964

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung.....1

B. Deskriptive Untersuchungen
1. Vorbemerkungen zur Methode.....3
2. Ergebnisse
a) histologische und cytologische Untersuchungen.....4
b) chemische Untersuchungen.....10

C. Experimentelle Untersuchungen
1. Vorbemerkungen zur Methode.....15
2. Ergebnisse
a) cytologische Untersuchungen nach Pilokarpinreizung.....17
b) autoradiographische Untersuchungen zum Eiweiss- und Nukleinsäurestoffwechsel.....20
c) histochemischer Phosphatidnachweis.....23

D. Besprechung der Ergebnisse
a) Morphologie und chemische Zusammensetzung der Stanniusschen Körperchen.....25
b) Sekretionsmechanismus.....28
c) Beschaffenheit des Sekrets.....35
d) Stoffwechsel der Stanniusschen Körperchen.....37

E. Zusammenfassung.....43

F. Material und Methoden.....45

G. Literaturverzeichnis.....55

Anhang: Abbildungen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A. Einleitung

Stanniussche Körperchen (StK) sind Organe, die man bisher nur bei Knochenfischen gefunden hat. Seit ihrer Entdeckung durch Stannius (1839) haben sich verschiedene Autoren bemüht, ihre Bedeutung aufzuklären, jedoch ohne Erfolg. Selbst Angaben über den Aufbau und die Funktionsweise sind widerspruchsvoll. Die StK entstehen während der Ontogenese aus dem primären Harnleiter (Garret 1942). Bei primitiven Knochenfischen treten sie in Vielzahl, bei höheren paarig auf. Bei den Gobioidea findet man nur ein Stanniussches Körperchen (Bauchot 1953).

Ecker (1846) deutete die Stanniusschen Körperchen als Nebennierenrindenorgane. Grosglik (1885) hielt sie dagegen für Homologa des Nebennierenmarks höherer Wirbeltiere. Einen Beweis für die Vermutung, dass die Stanniusschen Körperchen drüsige, und zwar inkretorische Organe seien, ist bis heute nicht erbracht. Nach Vincent (1897) ist der Blutdruck von Mäusen nach Injektionen von Extrakten aus Stanniusschen Körperchen nicht erhöht, während Suprarenalkörperextrakte von Selachiern einen deutlichen Effekt hervorrufen. Die StK können demnach nicht als Suprarenalorgane und damit auch nicht als Homologa des Nebennierenmarks gedeutet werden. Giacomini kommt aufgrund zahlreicher Untersuchungen zu dem Schluss (1922), dass die StK auch mit der Nebennierenrinde nicht homologisiert werden können. In neuerer Zeit vermuten Fontaine und Leloup-Hatey (1959), dass die StK wegen ihres hohen Gehaltes an Ascorbinsäure (1955) und Hydrocortison (1959) der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde höherer Wirbeltiere homolog seien. Phillips und Mulrow (1959) und Ford (1959) versuchten, in den StK Corticosteroide nachzuweisen, kamen jedoch zu einem negativen Ergebnis. Dass die StK nicht unter Kontrolle der Hypophyse stehen, haben Rasquin (1951), Pickford (1953) und Chavin (1954) gezeigt. Nach einer Hypothese von Rasquin (1956) sollen die StK eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation der Knochenfische spielen. Dabei soll der Wirkstoff, den die StK bilden, antagoni-

stisch zum antidiuretischen Hormon Vasopressin wirken. Vasopressin, so hatten verschiedene Untersuchungen gezeigt, wirkt bei Knochenfischen nicht wie bei höheren Wirbeltieren antidiuretisch. In Vorversuchen zu dieser Arbeit (Ristow und Piepho unveröffentlicht) wurde jedoch festgestellt, dass Vasopressin beim Flussaal auch dann nicht antidiuretisch wirkt, wenn man den Tieren die StK exstirpiert. Damit bleibt die biologische Bedeutung der Stanniusschen Körperchen weiterhin im Dunkel.

Aber nicht einmal der Sekretionsmechanismus der StK ist bisher voll aufgeklärt. Pettit (1896) und Bobin (1949) sowie Olivereau (1961) beschreiben die Stanniusschen Körperchen als endokrine Drüsen, die aus einzelnen zylindrischen Schläuchen mit einem Lumen aufgebaut seien. Das Sekret soll in Form ganzer Zellen, also holokrin in das Lumen geschüttet werden. Vincent (1897), Giacomini (1911) und Diamare (1933) deuten das Lumen als Artefakt, während Aboim (1946) sich nicht festlegt.

Das Ziel dieser Arbeit*) musste zunächst sein, die StK mit histologischen und cytologischen Methoden noch einmal genau zu untersuchen und den Sekretionsmechanismus der Organe, soweit das mit morphologischen Methoden überhaupt möglich ist, zu analysieren. Diese Befunde sollten durch chemische und autoradiographische Arbeiten**), insbesondere über den Eiweiss- und RNS-Stoffwechsel, ergänzt werden.

---

*) Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Piepho, schulde ich grossen Dank für die Anregung und stete Förderung dieser Arbeit. Herrn Priv.-Doz. Dr. Fr. W. Schlote danke ich für die Einführung in die elektronenmikroskopische Technik.

**) Die autoradiographischen und chemischen Untersuchungen wurden im Institut für Medizinische Isotopenforschung, Köln, durch geführt. Seinem Leiter, Herrn Prof. Dr. W. Maurer, danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut Mein Dank gilt weiterhin Herrn Doz. Dr. F. Antoni für die Einführung in die chemischen Arbeitsmethoden und für sein reges Interesse am Fortgang der Untersuchungen sowie Herrn Dipl.Che N. Nouvertné für die Bereitung der radioaktiven Substanzen.

B. Deskriptive Untersuchungen

1. Vorbemerkungen zur Methode

a) histologische Untersuchungen

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden die Stanniusschen Körperchen von 6 - 70 cm langen Flussaalen (Anguilla anguilla L.) 1) in dem Fixierungsgemisch nach Carnoy, 2) in ungepufferter OsO_4-Lösung und 3) in gepufferter OsO_4-Lösung fixiert. Die nach 1) und 2) fixierten Stanniusschen Körperchen wurden in Paraffin, die nach 3) fixierten in Methacrylat eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin bzw. Azan gefärbt oder ungefärbt mit einem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Stanniussche Körperchen von etwa 25 - 30 cm langen Flussaalen in gepufferter OsO_4-Lösung und in gepufferter $KMnO_4$-Lösung fixiert und in Methacrylat, Vestopal oder Araldit eingebettet. Messungen führte ich, wenn nicht anders vermerkt, an osmiumfixiertem Material durch.

b) chemische Untersuchungen

Um die chemische Zusammensetzung der Stanniusschen Körperchen zu ermitteln, bestimmte ich mit Hilfe einer modifizierten Schmidt-Tannhauser-Methode den DNS-P- und den RNS-P-Gehalt sowie gravimetrisch den Protein-Gehalt. Ferner stellte ich eine lipidhaltige Fraktion her und untersuchte diese qualitativ. Die chemischen Untersuchungen führte ich in 4 Serien durch. Kontrollorgane waren Leber und Niere von Aalen.

Eine genaue Beschreibung der Methoden ist im Abschnitt F. gegeben.

2. Ergebnisse

a) histologische und cytologische Untersuchungen

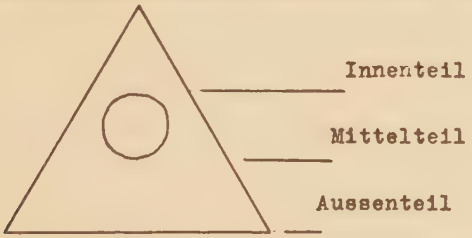
Bei den untersuchten Aalen lagen die Stanniusschen Körperchen mehr oder weniger in dem Nierenparenchym eingebettet, und zwar an der Stelle, an der die beiden Schenkel des Mesonephros zusammengewachsen sind. In wenigen Fällen habe ich nur ein, in einem Fall drei StK gefunden. Bei Glasaalen hatten die kleinsten StK einen Durchmesser von weniger als einem halben Millimeter, die der grössten Aale dagegen einen von 0.5 cm. Auch bei gleichgrossen Tieren schwankte die Grösse der StK beträchtlich.

Stanniussche Körperchen bestehen aus Drüsensträngen, die in ihrer Gesamtheit von einer bindegewebigen Kapsel umgeben sind (Abb. 1). Ihre Anzahl schwankt zwischen einigen wenigen bei Glasaalen und mehreren hundert bei grossen Tieren. Die Drüsenstränge der StK kleiner Aale haben eine ovale bis kugelförmige Gestalt, die grosser Tiere sind langgestreckt und oft eingefaltet. Jeder Drüsenstrang wird von einer bindegewebigen Kapsel und weitlumigen Blutkapillaren umgeben(Abb. 2, 3).

Die Drüsenstränge sind von einem ein- oder mehrschichtigen Epithel ausgekleidet. Je nach Fixierung kann man in ihrem Inneren eine mehr- oder minder grosse Lichtung sehen. Diese ist nach saurer Fixierung besonders gross (Abb. 2, 3), nach Fixierung mit ungepufferter OsO_4-Lösung kleiner (Abb. 4). Abb. 5 zeigt das elektronenmikroskopische Bild einer Lichtung, wie ich sie manchmal nach Fixierung mit gepufferter OsO_4-Lösung und anschliessender Einbettung in Methacrylat beobachtet habe. Es zeigt sich, dass die Lichtung auf einer Zerreissung oder Schrumpfung des Gewebes beruht, die durch das Fixierungsmittel oder die Einbettung entstanden sein kann.

Im elektronenmikroskopischen Bild ähneln die StK-Zellen Kreiskegeln, deren Spitzen lang ausgezogen und untereinander verflochten sein können. Der Bereich im Drüsenstrang, der nach saurer Fixierung im lichtmikroskopischen Bild als Lumen erscheint, besteht aus offensichtlich sehr empfindlichen Zellfortsätzen. Bei den sauer fixierten Stanniusschen Körperchen habe ich in den Lichtungen der Drüsenstränge oft Zellkerne

gefunden (Abb. 3). Diese unterscheiden sich jedoch in Form und Anfärbbarkeit nicht von denen anderer Zellen. Die StK-Zelle ist durchschnittlich 12 - 15 µ hoch, ihre Grundfläche hat einen Durchmesser von 3 - 4 u. Obgleich sie in ihrer äusseren Form der Pankreaszelle ähnelt (wenn man von der Spitze absieht), so kann man doch nicht wie dort vom apikalen und basalen Zellpol sprechen. Den Begriffen apikal und basal liegen physiologische Kenntnisse zugrunde, die wir von den StK bisher nicht haben. Ich benenne deshalb die Teile der Zelle wie folgt:



Die Bezeichnungen Innen-, Mittel- und Aussenteil beziehen sich auf die Lage der Zelle im Drüsenstrang. Der Innenteil der Zelle ist also der dem Inneren des Drüsenstranges zugewandte Zellteil, der Aussenteil grenzt dagegen meist an ein Blutgefäss.

Es seien nun im einzelnen die Zellorganellen und weitere Differenzierungen der StK-Zelle, wie sie im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen, beschrieben.

Die Zellgrenzmembran

Die Zelle ist von einer Membran umgeben, welche im Mittel 80 A dick ist. Die zum Blutgefäss hin begrenzende Membran (sie entspricht morphologisch der Basalmembran der Pankreaszelle) ist etwas dicker. Abb. 6 zeigt, dass die Zellgrenzmembran aus zwei osmiophilen Untereinheiten und einer osmiophoben Untereinheit besteht. Die osmophilen haben eine Dicke von 20 - 30 A, die osmiophobe von 30 - 40 A. Die Zellen werden durch einen Zwischenraum, der durchschnittlich 100 A ist, von einander getrennt. Bei in Kaliumpermanganat-Lösung fixierten Objekten ist der Zwischenraum zwischen zwei Zellgrenzmembranen manchmal blasenförmig erweitert(Abb. 8). Er ist nicht elektronen-

optisch leer, sondern mit einer körnigen Substanz gefüllt. Die Zellgrenzmembran kann an solchen Stellen von vielen 50 - 500 A weiten Poren durchbrochen sein. Auch an anderen Stellen habe ich Poren unterschiedlicher Weite, jedoch in geringerer Zahl beobachtet.

Der Zellkern

Der etwa 5 µ lange und 3 µ breite Zellkern liegt meistens im Mittelteil, manchmal auch im Aussenteil der Zelle. Im elektronenmikroskopischen Bild erscheint er länglich. Oft habe ich Eindellungen beobachtet. Jeder Kern wird von einer Doppelmembran umgeben. Die äussere Membran ist mit Ribosomen besetzt und ähnelt somit einer Ergastoplasmamembran. Während die innere Kernmembran stets dicht der Kernsubstanz anliegt, befindet sich zwischen äusserer und innerer Membran ein Zwischenraum, der im Mittel 150 A beträgt.

Im lichtmikroskopischen Bild enthält der Zellkern einen mit basischen Farbstoffen stark anfärbbaren Nukleolus und verhältnismässig wenige Chromatinbröckchen (Abb. 3). Im elektronenmikroskopischen Bild besteht die Kernsubstanz osmiumfixierter Gewebe aus granulärem und flockigem Material. Die kleinsten granulären Partikel haben die Grösse von Ribosomen, die grössten sind etwa doppelt so gross. Man kann zwischen elektronendichtem und weniger -dichtem Kernmaterial unterscheiden. Das erstere, in der Literatur als Chromatin gedeutet, liegt der inneren Kernmembran auf und reicht mehr oder minder tief in das Innere des Kernes hinein. An Stellen, an denen das letztere der inneren Membran aufliegt, habe ich oft Poren beobachtet (Abb. 7). Diese durchbrechen die äussere und innere Kernmembran und bilden einen kurzen Porenkanal. Die mittlere Porenweite beträgt 500 A. In permanganatfixierten Objekten erscheint der Zellkern elektronenoptisch leer (Abb. 8, 9). Nur der Nukleolus ist als wabiges Gebilde gut sichtbar (Abb. 20).

Das endoplasmatische Retikulum und die Ribosomen

Man kann oft beobachten, dass sich von der äusseren Kernmembran endoplasmatisches Retikulum (ER) abfaltet (Abb. 9), das nach Fixierung mit OsO_4 mit Ribosomen besetzt erscheint. Das ER, dessen Membranen etwa 50 A dick sind, lässt sich in der ganzen Zelle, besonders aber im Aussenteil feststellen. Eine Vorzugsrichtung haben die ER-Membranen in ungereizten Drüsenzellen selten. Sie liegen dann parallel zur Längsachse der Zelle. Die lichte Weite der ungeordneten ER-Zisternen beträgt 330 - 1000 A, die der geordneten etwa 170 - 500 A. Ob die ER-Zisternen untereinander in Verbindung stehen, habe ich nicht feststellen können. Endoplasmatisches Retikulum ohne Ribosomen habe ich in ungereizten Drüsenzellen nie gefunden. Auch habe ich nicht beobachtet, dass sich ER-Membranen von der Zellgrenzmembran abfalten.

Nach OsO_4-Fixierung erscheinen die Ribosomen in den Zellen der StK als etwa 150 A grosse, mehr oder minder dichte Partikel. Man findet sie besonders im Aussenteil der Zelle sehr reichlich. Sie haften dort entweder an ER-Membranen oder liegen frei im Cytoplasma (Abb. 6). Seltener sind sie im Bereich des Golgi-Apparates zu finden (Abb. 10). In permanganatfixierten Geweben sind Ribosomen nicht zu sehen (Abb. 9).

Der Golgi - Apparat

Im Mittelteil der Zelle, meist in der Nähe des Kernes findet man fast immer einen gut ausgebildeten Golgi - Apparat. Er besteht bei osmiumfixierten Geweben aus parallel zu einander angeordneten Golgi - Zisternen, verschieden grossen Vakuolen und leeren oder mit osmiophilem Material angefüllten Vesikeln (Abb. 10). Die Golgi - Membranen haben eine Dicke von etwa 60 A. In permanganatfixierten Objekten sieht der Golgi - Apparat ähnlich aus, nur erscheinen die Zisternen wesentlich länger. Die längsten mit dieser Technik beobachteten Golgi - Membranen, haben eine Länge von 5 µ (Abb. 11). In der Nähe befindliche Vakuolen und Vesikel sind stets elektronenoptisch leer. Die Doppellamellen, die man im elektronenmikroskopischen Bild beobachtet, laufen nicht streng parallel, sondern sind an

vielen Stellen aufgebläht und bilden kleine " Segmente ". Besonders an den Enden der Golgi - Zisternen liegen zahlreiche Vesikel. In den permanganatfixierten Objekten beträgt die lichte Weite der nicht aufgeblähten Golgi - Zisternen 200 - 300 A, an den aufgeblähten Stellen zwischen 800 und 1000 A, an den schmalsten Stellen etwa 100 A (Abb. 11).

Sowohl in permanganat- als auch in osmiumfixierten Geweben liegen oft neben den beschriebenen Golgi - Zisternen etwas abseits ein oder zwei Zisternen, deren Lamellen immer streng parallel laufen. Ihre lichte Weite beträgt fast einheitlich 100 A. Sie sind also ebenso weit wie typische Golgi - Zisternen an den schmalsten Stellen (Abb. 11).

Eine Verbindung zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi - Zisternen habe ich nie beobachtet.

Die Mitochondrien

Die Zellen der Stanniusschen Körperchen enthalten eine grosse Anzahl von Mitochondrien. Die meisten liegen im Aussenteil, also dort, wo sich die Hauptmenge der Sekretgranula befindet. Sie sind im Durchschnitt etwa 0.8 - 1 µ lang, können jedoch auch erheblich grösser oder kleiner sein.

Die Mitochondrien werden von zwei Membranen umgeben. Die innere faltet sich ein und bildet Cristae (Abb. 12); jedoch sind diese weitlumiger als die der Mitochondrien eines Säugerpankreas und ähneln manchmal den Röhrchen der von Wohlfahrt-Bottermann (1956) beschriebenen Röhrchenmitochondrien bei Paramecium. Um auszuschliessen, dass es sich bei den weiten Lumina um artifiziell aufgeblähte Cristae handelt, wurden Teile eines Pankreas der Maus in gleicher Weise wie die StK des Aales fixiert und eingebettet. Die Mitochondrien des Mauspankreas zeigen die typischen, in der Literatur beschriebenen Cristae (Abb. 16).

Neben den beschriebenen Mitochondrien findet man in den StK-Zellen nach Permanganatfixierung solche, bei denen die äussere Membran nicht vollständig vorhanden ist (Abb. 14 e). Sie kann sogar völlig fehlen. Dann ist das Mitochondrium mit körnigem Material angefüllt (Abb. 14 b, c). Charakteristisch

bleiben jedoch die Einfaltungen der Membran. Schliesslich findet man Körper, die kleiner sind als die beschriebenen, nicht deren ovale Form haben, sondern amöbenartig aussehen. Auch sie können Einfaltungen haben. Es hat den Anschein, als ob diese Körper kleinere abschnüren (Abb. 14 a).

Die beschriebenen Formen, die man nur im Mittelteil der Zellen findet, lassen sich als Stadien einer Entwicklungsreihe deuten. Am Anfang dieser Reihe, die denen anderer Autoren ähnelt (Weissenfels 1957, 1958, Wohlfahrt-Bottermann 1957), stehen amöbenartige Körper, die von einer Membran umgeben werden und eine körnige Grundsubstanz enthalten. In einem späteren Stadium faltet sich die Membran zu Cristae ein, und die körnige Grundsubstanz verschwindet. Schliesslich wird eine zweite Membran aufgelegt.

Abb. 13 zeigt ein vollständig ausgebildetes Mitochondrium, das sich möglicherweise in Teilung befindet.

In permanganatfixierten Objekten sieht man manchmal Mitochondrien, denen an einem ihrer beiden Enden die äussere Membran fehlt, während die innere zu einem Strang ausgezogen ist (Abb. 15 a, b, c). Solche Formen habe ich nur im Aussenteil der Zelle, oft in unmittelbarer Nähe von Sekretgranula gefunden. Möglicherweise stellen sie Abbaustadien dar.

Die Sekretgranula

In den Zellen der Stanniusschen Körperchen finden sich hauptsächlich im Aussenteil, aber auch im Mittel- und Innenteil Granula, die nach Fixierung mit OsO_4, nicht aber mit dem Gemisch von Carnoy, bereits lichtmikroskopisch (Abb. 4) sichtbar sind. Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen sie nach Fixierung mit OsO_4 (Abb. 12), nicht aber nach Fixierung mit $KMnO_4$ (Abb. 8). Mit Bleisalz- und Uranylsalz-Lösungen kann man die oft körnige osmiophile Substanz intensiv nachkontrastieren (Abb. 12). Diese Granula werden von Bobin 1949 als Sekretgranula gedeutet.

Die grössten Sekretgranula messen etwa 0.4 µ, die kleinsten etwa 0.04 µ im Durchmesser. Sie sind sowohl im Bereich des Golgi - Apparates als auch im Aussenteil der Zelle anzutreffen.

In ungereizten Drüsen sind alle Sekretgranula von einer 70 Å dicken Membran umgeben. Diese liegt jedoch nicht eng der osmiophilen Substanz an, vielmehr besteht zwischen beiden ein Zwischenraum (Abb. 12), der bei grossen Granula besonders weit sein kann. Es kann sich hierbei kaum um ein Fixierungsartefakt handeln, denn bei einem in gleicher Weise fixierten Mauspankreas liegt die Zymogengranulamembran eng der osmiophilen Substanz auf (Abb. 16). In permanganatfixierten Objekten werden nur die Membranen der Sekretgranula dargestellt. Diese erscheinen oft durchlöchert (Abb. 8).

b) chemische Untersuchungen

Als Grundlage für die cytochemische und stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Stanniusschen Körperchen ist es notwendig, etwas über ihre chemische Zusammensetzung zu erfahren. Meine chemischen Untersuchungen, die ich in diesem Kapitel beschreibe, habe ich in 4 Serien durchgeführt. Für die Serie 1 benutzte ich 20, für die Serien 2, 3 und 4 je 50 StK. Da das Frischgewicht eines StK etwa 1 mg beträgt, stand mir für die einzelnen Serien nur wenig Material zur Verfügung.

Tabelle 1 gibt Auskunft über das Frischgewicht von Stanniusschen Körperchen und den Kontrollorganen Leber und Niere einzelner Serien sowie über das Gewicht nach Gefriertrocknung und Lipidextraktion. In einem Säulendiagramm (Abb. 17) sind die Ergebnisse übersichtlich zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die nicht mechanisch zerkleinerten Organe nach Gefriertrocknung verhältnismässig wenig Wasser verloren haben. Die StK verloren etwas weniger als 20 %, die Leber 35 % und die Niere wenig mehr als 20 % Wasser. Kontrollversuche an Aal- und Rattenleber ergaben, dass auch nach langen Trocknungszeiten in dem für die Untersuchungen verwandten Kryostaten das Gewicht nicht weiter abnahm (Tab. 2).

Die Gewichtsbestimmung nach Lipidextraktion (Tab. 1) ergab, dass die StK im Mittel 6 % ihres Frischgewichtes wogen, Leber- und Nierengewebe 10 - 13 %, also doppelt so viel wie die StK. Das Gewicht der in Äthanol, Chloroform und Äther löslichen

Tabelle 1

Gewichtsbestimmungen
einzelner Fraktionen des Stanniusschen Körperchen, Leber und Niere

Serie Nr.	Organ	Frischgewicht (Fg.) [mg]	Gewicht nach Gefriertrocknung [mg]	Gewicht nach Lipidextraktion (= Rest) [mg]
1	StK	20.2	-	-
2		50.3	39.1 = 77.7 % d.Fg.	3.8 = 7.5 % d.Fg.
3		48.9	39.5 = 80.8 %	2.8 = 5.7 %
4		40.7	33.2 = 81.6 %	2.3 = 5.6 %
2	Leber	68.2	40.9 = 60.0 %	7.0 = 10.1 %
3		75.0	45.9 = 61.2 %	-
4		42.2	29.3 = 69.4 %	5.8 = 13.8 %
2	Niere	56.2	43.2 = 76.9 %	7.6 = 13.2 %
3		66.3	51.8 = 78.1 %	6.8 = 11.8 %
4		67.4	52.2 = 77.4 %	7.7 = 11.2 %

Tabelle 2

Trockengewichtsbestimmungen
von Aalleber und Rattenleber im Kryostaten

Organ	Frischgewicht (Fg.) [mg]	Trockengewicht n. 18 Std. [mg]	Trockengewicht n. 48 Std. [mg]	Trockengewicht n. 96 Std. [mg]
Aalleber	128.4	81.4 = 63 % d.Fg.	81.2	81.2
Rattenleber	84.7	61.0 = 72 %	60.9	60.6

Fraktion betrug bei den StK 74 %, bei der Leber 52 % und bei der Niere 65 % ihres Frischgewichtes.

Die Restfraktion, die im wesentlichen noch Proteine, RNS und DNS enthält, ist bei den StK nur halb so gross wie bei den Kontrollen. Da der DNS- und RNS-Gehalt sehr gering ist und in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden kann, stellt die Rest-Fraktion im wesentlichen die Protein-Fraktion dar.

Bei der Bestimmung von DNS-P und RNS-P habe ich Werte ermittelt, die in Tabelle 3 dargestellt sind.

Tabelle 3

DNS-P- und RNS-P-Gehalt
von
Stanniusschen Körperchen, Leber und Niere des Flussaales

Serie Nr.	Organ	Frisch-gewicht (Fg.) [mg]	DNS-P total [µg]	DNS-P/mg Fg. [µg]	RNS-P total [µg]	RNS-P/mg Fg. [µg]
1	StK	10.0	2.06	0.206	6.7	0.672
2		50.3	9.15	0.182	42.3	0.841
3		48.9	6.10	0.127	36.7	0.751
4		40.7	10.35	0.254	32.7	0.804
2	Leber	68.2	7.53	0.110	73.4	1.076*)
4		42.2	6.32	0.150	26.6	0.630
2	Niere	56.2	3.04	0.54	34.0	0.606
3		66.3	5.69	0.86	58.5	0.882
4		67.4	2.79	0.41	43.6	0.646

*) Der hohe RNS-P-Gehalt der Leber der 2. Serie beruht wahrscheinlich auf fehlerhafter Analyse.

Bildet man das Verhältnis RNS-P : DNS-P und proteinhaltiger Rest : DNS-P sowie proteinhaltiger Rest : RNS-P, so ergeben sich Werte, die in Tabelle 4 dargestellt sind.

Tabelle 4

Verhältnis RNS-P : DNS-P, proteinhaltiger Rest : DNS-P und proteinhaltiger Rest : RNS-P

Serie Nr.	Organ	RNS-P / DNS-P	Rest / DNS-P	Rest / RNS-P
1	StK	3.26	-	-
2		4.62	415	90
3		6.02	460	76
4		3.16	222	70
2	Leber	(9.75)	930	(95)
4		4.21	914	218
2	Niere	1.12	250	223
3		1.03	120	116
4		1.56	276	176

Das Ergebnis der qualitativen Untersuchung des lipidhaltigen Extraktes der Stanniusschen Körperchen ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Reaktion auf quartäre Amine war nicht eindeutig positiv.

Tabelle 5

Qualitative Untersuchungen des lipidhaltigen Extraktes der Stanniusschen Körperchen nach alkalischer Hydrolyse

Probe auf	Methode	Ergebnis
Lipide	Bromthymolblau	+
primäre Amine	Ninhydrin	+
quartäre Amine	Dragendorff-Färbung	(+)
Steroide	Toluolsulfonsäure	-
Phosphat	Hanes-Isherwood-Reagens	+

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus den StK eine grosse lipidhaltige, jedoch nur e ine kleine proteinhaltige Fraktion sowie viel RNS isoliert werden konnten.

C. Experimentelle Untersuchungen

1. Vorbemerkungen zur Methode

a) Pilokarpin - Reizung

Etwa 25 - 30 cm langen Flussaalen wurden 0.5 ml einer 1 %igen Pilokarpinlösung intraperitoneal injiziert. 10 Stunden danach tötete ich die Aale und fixierte ihre Stanniusschen Körperchen entweder in OsO_4- oder in $KMnO_4$-Lösung. In einigen Fällen wurden StK vor der OsO_4-Fixierung in einer gepufferten Formollösung vorfixiert. Anschliessend entwässerte ich die Objekte und bettete sie in Methacrylat, Vestopal oder Araldit ein. Ultradünne Schnitte wurden elektronenmikroskopisch untersucht. In einigen Fällen wurden formolvorfixierte StK in einer 0.2 %igen Ribonukleaselösung bei 37° C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 30 und 60 Min. wurden Teile der Organe aus dem Medium herausgenommen, in OsO_4-Lösung fixiert und für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weiter verarbeitet.

b) H^3 - Leucin- und H^3 - Cytidin - Inkorporation

Um Untersuchungen zum Eiweissstoffwechsel der Stanniusschen Körperchen durchführen zu können, injizierte ich Aalen vergleichbare Mengen an H^3 - Leucin intraperitoneal, tötete die Tiere 45 Min., 90 Min., 2 Std., 4 Std., 7 Std. und 12 Std. nach der Injektion und stellte von den StK sowie zur Kontrolle von der Leber und Niere Autoradiogramme her, die ich lichtmikroskopisch untersuchte. Von einem Tier, das 2 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion getötet worden war, stellte ich Autoradiogramme her, die ich elektronenmikroskopisch untersuchte. Zwei Aale wurden 10 Std. vor einer H^3 - Leucin - Injektion mit Pilokarpin belastet und 90 Min. danach getötet. Von den StK, der Leber und Niere wurden wiederum Autoradiogramme hergestellt. Eines der beiden Tiere hatte die gleiche Menge an H^3 - Leucin wie die ungereizten Aale erhalten. Ich wertete deshalb die Autoradiogramme nur von diesem Tier quantitativ aus.

Um Weiteres über die Wirkungsweise des Pilokarpins zu erfahren, untersuchte ich isolierte Stanniussche Körperchen autoradiographisch. Dazu wurden 4 StK in ein H^3 - Leucin - haltiges Medium, 4 weitere in ein gleiches, das jedoch zusätzlich 40 γ /ml Pilokarpin enthielt, inkubiert. Nach 15, 30, 60 und 90 Min. wurde je 1 StK beider Serien fixiert und autoradiographisch untersucht.

Um Untersuchungen zum Nukleinsäurestoffwechsel der StK durchführen zu können, injizierte ich einem Aal H^3 - Cytidin i. p.. Ein weiteres Tier wurde mit Pilokarpin belastet und erhielt 10 Std. danach eine vergleichbare Menge H^3 - Cytidin. Nach weiteren 90 Min. wurden die beiden Tiere getötet und von den StK sowie von Leber- und Nierengewebe Autoradiogramme hergestellt.

c) Phospholipide

Zum histochemischen Nachweis von Phospholipiden führte ich den Baker - Test an ungereizten und mit Pilokarpin gereizten StK durch. Zur Kontrolle wurden ungereizte StK mit Pyridin behandelt, um sämtliche Fette und Lipide zu extrahieren. In einem weiteren Kontrollversuch wandte ich an StK die Schultz - Reaktion an, um Steroide in den Organen nachzuweisen.

Eine genaue Beschreibung von Material und Methoden befindet sich im Abschnitt F.

2. Ergebnisse

a) cytologische Untersuchungen nach Pilokarpin-Reizung

Bereits an lichtmikroskopischen Kontrollschnitten lässt sich erkennen, dass Pilokarpin die Stanniusschen Körperchen zur Sekretion reizt. Während Zellen der ungereizten Drüsen annähernd gleichviele und gleichgrosse Sekretgranula enthalten (Abb. 18), gibt es in gereizten Drüsen Zellen, die prall mit grossen Sekretgranula angefüllt sind und andere, die nur kleine enthalten, in wiederum anderen lassen sich lichtmikroskopisch keine Sekretgranula erkennen (Abb. 19).

Das gleiche und weiteres zeigt sich, wenn man pilokarpingereizte Drüsen elektronenmikroskopisch untersucht: Zellen, in denen keine Sekretgranula vorhanden sind, haben ein annäh-ernd parallel zu ihrer Längsachse verlaufendes endoplasmatisches Retikulum und nur wenige Mitochondrien im Mittel- oder Innenteil der Zelle (Abb. 20). Die lichte Weite der Ergastoplasmazisternen beträgt 170 - 500 A.

In anderen Zellen, ebenfalls ohne oder mit nur wenigen Sekretgranula, sind dagegen Mitochondrien zwischen ER-Strängen, d. h. im Aussenteil, in grosser Anzahl vorhanden (Abb. 21). In solchen Zellen findet man im Aussenteil neben typisch aussehenden Ribosomen runde vesikuläre Gebilde (160 A) mit einem hellen Innenhof. Daneben liegen oft ähnliche, ebenfalls vesikuläre, jedoch etwas grössere (300 A), rundliche Gebilde, die teilweise oder ganz mit einer osmiophilen Substanz angefüllt sind. Zwischen diesen und den typischen Sekretgranula finden sich alle Übergänge (Abb. 22). Auffällig ist, dass die Ribosomenanzahl an Orten, an denen Vesikel oder kleine Sekretgranula liegen, verringert ist, während 160 A grösse vesikuläre Gebilde häufig zu finden sind (Abb. 22). Darüber hinaus habe ich beobachtet, dass die ER-Stränge in der Nähe kleiner Sekretgranula ihre parallele Anordnung verlieren, zerreissen und ihre Zisternen sich erweitern. Der Beginn der Auflösung von endoplasmatischem Retikulum lässt sich in Abb. 23 erkennen.

Abb. 20 zeigt Ausschnitte von mehreren permanganatfixierten Zellen, die sich offensichtlich in verschiedenen Stadien der Sekretbildung befinden. Zelle I enthält keine Sekretgranula. Ihre ER-Zisternen liegen parallel zueinander. Mitochondrien sind im äusseren Teil nicht zu finden. Die Zellen II und III enthalten dagegen eine Anzahl kleiner Sekretgranula, wobei die kleinsten, die etwa einen Durchmesser von 1000 A haben, noch nicht allseitig von einer Membran umgeben sind. Vesikuläre Ribosomen und Vesikel, die man nach Fixierung mit OsO_4 beobachten kann, sind hier nicht zu finden. In den Zellen II und III, fällt ferner auf, dass das Ergastoplasma seine parallele Anordnung verloren hat und die Zisternen zerrissen sind.

In den pilokarpingereizten Zellen der Stanniusschen Körperchen findet man häufig inselartige Ansammlungen 160 A grosser osmiophiler Partikel. Solche Inseln sind dadurch gekennzeichnet, dass sie nur wenige oder keine Membranen enthalten. Manchmal habe ich beobachtet, dass die 160 A grossen Partikel kettenartig oder haufenförmig aneinander lagern (Abb. 24, 25). Oft sieht man an solchen Stellen amorph erscheinende Substanzen, die in ihrer elektronenoptischen Dichte Sekretgranula entsprechen, jedoch keine Membran besitzen. Andere osmophile Substanzen sind dagegen teilweise oder ganz von einer Membran umgeben und unterscheiden sich nicht von Sekretgranula. Von diesen bis zu den grossen Sekretgranula sind alle Übergänge zu finden.

Innerhalb der Golgi - Zisternen lassen sich ebenfalls osmiophile Substanzen erkennen, die in ihrer elektronenoptischen Dichte Sekretgranula entsprechen, Auch ausserhalb von ihnen kann man solche Körper sehen. Sie sind dort von einer Membran umgeben und stellen typische Sekretgranula dar.

In Zellen mit grossen Sekretgranula sind nur noch kurze, stark erweiterte ER-Zisternen zu finden. Die Anzahl der Mitochondrien hat abgenommen (Abb. 20, Zelle IV, Abb. 21). Bei den grössten Granula ist die osmiophile Substanz nicht scharf begrenzt, sondern am Rande diffus; der Zwischenraum zwischen ihr und der umgebenden Membran ist oft gross. In

einem Fall habe ich ein solches Sekretgranulum gefunden, das zwischen 2 Zellen liegt(Abb. 26) Abb. 27 zeigt eine Zelle mit nur wenigen grossen Sekretgranula und einer Anzahl elektronenoptisch leerer Vakuolen. Interessant ist, dass diese Zelle agranuläres endoplasmatisches Retikulum enthält, das ich sonst nie beobachtet habe. Ribosomen sind hier seltener als in anderen Zellen.

Schnitte von 10 Min. lang mit Ribonuklease behandelten Stanniusschen Körperchen zeigen, dass die an ER-Membranen haftenden und frei im Cytoplasma liegenden 160 A grossen Partikel einen hellen Innenhof haben. Die Partikel in der oben beschriebenen " Insel " (s. S. 19) erscheinen dagegen unverändert (Abb. 28). 5 Min. lang mit Ribonuklease behandelte StK zeigen keine Veränderungen. Länger als 10 Min. behandelte unterscheiden sich nicht von den 10 Min. lang inkubierten.

b) autoradiographische Untersuchungen zum Eiweiss- und Nukleinsäurestoffwechsel

Versuche mit H^3 - Leucin

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen von Autoradiogrammen nach H^3 - Leucin - Injektion erbrachten folgendes: Über Stanniusschen Körperchen, die 45 Min. nach der H^3 - Leucin - Injektion fixiert wurden, liegen die Silberkörner diffus verteilt (Abb. 29 a). Die mittlere Silberkornzahl beträgt umgerechnet auf einen Tag Expositionszeit 1.2 pro Zelle. Autoradiogramme der StK von Tieren, die 90 Min. nach der Injektion getötet wurden, zeigen eine schwache Ansammlung von Silberkörnern in Kernnähe. Die Kornanzahl pro Zelle hat sich nicht wesentlich erhöht, sie beträgt im Mittel 1.4. 2 - 4 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion beobachtet man einestarke Konzentration von Silberkörnern in Kernnähe,und zwar meist über dem Innenteil der Zelle(Abb. 29 b). Die mittlere Kornzahl beträgt nach 4 Std. 2 pro Zelle, umgerechnet auf einen Tag Expositionszeit. 7 Std. nach der Injektion sind diese Ansammlungen verschwunden. Statt dessen liegen Silberkörner über dem Aussenteil der Zelle angehäuft (Abb. 29 c). Die Kornzahl hat weiter zugenommen, sie beträgt im Mittel 5 pro Zelle. Autoradiogramme von Stanniusschen Körperchen, die 12 Std. nach der Injektion fixiert wurden, zeigen etwa die gleiche Anzahl von Silberkörnern wie die nach 7 Std. fixierten. Die Körner liegen jetzt jedoch diffus über den Zellen verteilt. Nur vereinzelt lassen sich Ansammlungen in der Nähe oder im Aussenteil der Zelle beobachten. Abb. 30 zeigt schematisch die Silberkornverteilung über einer StK-Zelle, wie man sie 45 Min., 2 - 4 Std., 7 Std. und 12 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion beobachtet.

Die Autoradiogramme zeigen ferner, dass die Zellen nicht gleichmässig, sondern sehr verschieden markiert sein können. So kommen Zellen vor, über denen auch nach langen Expositionszeiten keine, andere, über denen überdurchschnittlich viele Silberkörner liegen.

Die elektronenmikroskopisch untersuchten Autoradiogramme (Abb. 31 a, b, schem. Abb. 32) eines Stanniusschen Körperchens, das 2 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion fixiert worden war, lichtmikroskopisch also eine Ansammlung von Silberkörnern in Kernnähe zeigt, ergaben, dass sich 100 ausgezählte Silberkörner wie folgt verteilen: 76 über Vesikeln in der Nähe des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums, 6 über Kernen, 1 über einem Mitochondrium, 4 über ER-Zisternen, 1 über Golgi-Zisternen, 10 über kleinen Sekretgranula, 2 über oder unmittelbar neben Zellgrenzmembranen.

Die Autoradiogramme der Leber, die ich zur Kontrolle herstellte und lichtmikroskopisch untersuchte, zeigen lokal sehr unterschiedliche Schwärzungen. Die mittlere Silberkornanzahl über 700 Zellen einer Leber (das Tier wurde 90 Min. nach der Injektion getötet) beträgt umgerechnet auf einen Tag Expositionszeit 0.3 und ist etwa um den Faktor 5 geringer als bei den StK des gleichen Tieres. Die Niere ist noch unterschiedlicher markiert als die Leber, so dass ich darauf verzichtete, einen Mittelwert zu bilden. Es fällt auf, dass auch nach langer Expositionszeit nur etwa die Hälfte aller Parenchymzellen markiert ist. Auch die Schwärzung benachbarter Nierentubuli ist unterschiedlich.

Die Autoradiogramme von Aalen, die 10 Std. vor der H^3 - Leucin - Injektion mit Pilokarpin belastet und 90 Min. danach getötet worden waren, zeigen eine Silberkornanhäufung in Kernnähe. Ich wertete nur Autoradiogramme des Aales statistisch aus, der die gleiche Menge H^3 - Leucin erhalten hatte wie die unbelasteten Fische und fand, dass nach eintägiger Expositionsdauer über einer StK-Zelle im Mittel 3.1 Silberkörner liegen. Dieses sind etwa doppelt so viele wie über den ungereizten Drüsenzellen (Abb. 33 a, b). Die Autoradiogramme der Leber und Niere unterschieden sich nicht von denen unbelasteter Tiere.

Die Versuche mit H^3 - Leucin an isolierten StK erbrachten keine Unterschiede zwischen der Silberkorndichte über den im Inkubationsmedium mit Pilokarpin behandelten und den un-

behandelten Drüsen. Die statistische Auswertung ergab, dass nach eintägiger Expositionszeit die mittlere Silberkornzahl übereinstimmend nach 15 Min. 0.6, nach 30 Min. 1.3, nach 60 Min. 3.3, nach 90 Min. Inkubationszeit mehr als 3.3 beträgt. Nach 60 Min. Inkubationszeit lassen sich schwache Ansammlungen von Silberkörnern in Kernnähe beobachten, die nach 90 Min. verstärkt sind. Vereinzelt stellte ich auch Ansammlungen im Aussenteil der Zelle fest.

Versuche mit H^3 - Cytidin

Die Autoradiogramme der StK von Tieren, denen 90 Min. vor der Tötung H^3 - Cytidin injiziert worden war, ergaben, dass über den Zellen der Stanniusschen Körperchen auf einen Tag Expositionszeit umgerechnet im Mittel 0.65 Silberkörner liegen (Abb. 34 a). Wichtig ist, dass auch hier die Zellen der StK sehr unterschiedlich markiert sind. Ich zählte die Silberkörner über mehreren hundert Zellkernen und dem Cytoplasma und fand das Verhältnis

$$\frac{\text{Silberkornanzahl über dem Cytoplasma (Sk Cyt)}}{\text{Silberkornanzahl über dem Kern (Sk K)}} = 0.29.$$

Das bedeutet, dass über den Kernen etwa viermal mehr Silberkörner liegen als über dem Cytoplasma.

Die Leber ist wie im H^3 - Leucin - Versuch lokal sehr unterschiedlich markiert. Im Mittel liegen über einer Leberzelle 0.85 Silberkörner umgerechnet auf einen Tag Expositionszeit. Dieses sind mehr als über den Zellen der Stanniusschen Körperchen. Noch unterschiedlicher ist die Niere markiert. Hier fallen Zellen auf, die bereits nach kurzer Expositionsdauer extrem stark markiert sind. Die Autoradiogramme der Niere habe ich nicht statistisch ausgewertet.

In einem Parallelversuch belastete ich einen Aal 10 Std. vor der H^3 - Cytidin - Injektion mit Pilokarpin. 90 Min. nach der letzteren wurde das Tier getötet. Die statistische Auswertung der Autoradiogramme der StK ergab, dass nach eintägiger Expositionsdauer über einer Zelle im Mittel 0.15 Silberkörner liegen (Abb. 34 b). Dieses sind etwa viermal weniger als über den Zellen der ungereizten Drüse.

Der Quotient $\frac{Sk\ Cyt}{Sk\ K}$ beträgt 0.53. Die Silberkorndichte über dem Cytoplasma ist hier doppelt so gross wie über dem ungereizter Drüsenzellen.

Die Korndichte über der Leber des gereizten Tieres unterscheidet sich nicht wesentlich von der über der Leber des ungereizten.

Die beschriebenen Ergebnisse vermitteln einen Einblick in den Eiweiss- und Nukleinsäurestoffwechsel der Stanniusschen Körperchen. Sie werden im Abschnitt D. diskutiert. Ferner ergeben sich aus den Versuchen mit H^3 - Leucin, dass aktives Material vom Mittel- zum Aussenteil der Zelle, also dorthin, wo die meisten Sekretgranula liegen, wandert. Es liegt nahe, anzunehmen, dass das aktive Material als Protein in das Sekret eingebaut wird. Kasquin (1956) wies jedoch nach, dass die Sekretgranula der StK von Astyanax mexicanus Phosphatide enthalten. Aus diesem Grunde habe ich die Befunde von Kasquin nachgeprüft und durch eigene ergänzt.

c) histochemischer Phosphatidnachweis

Der Versuch, mit Hilfe des Baker-Tests Phosphatide nachzuweisen, hatte in einigen StK-Zellen ein positives Ergebnis: Diese sind blau gefärbt. Nachbarzellen reagierten dagegen negativ (Abb. 35). Sowohl positiv als auch negativ reagierende Zellen enthalten Sekretgranula. Auffällig ist, dass in den positiv reagierenden nur der mittlere und innere Teil intensiv blau gefärbt ist, während der äussere Teil, in dem die Hauptmenge der Sekretgranula liegt, aber nur eine schwache Blaufärbung zeigt. Die Blutzellen reagieren ebenfalls positiv. Zur Kontrolle untersuchte ich Nierengewebe: In den Zellen der Nierentubuli liegen blaue, d. h. positiv reagierende Granula.

Um auszuschliessen, dass es sich bei den positiv reagierenden Substanzen nicht um Lipide handelt, führte ich Kontrollversuche durch, in denen ich mit Pyridin alle Fette und Lipide aus dem StK ex trahierte: Eine Blaufärbung war jetzt nicht mehr zu erkennen (Abb. 36).

Es interessierte, zu erfahren, ob sich die Anzahl der positiv reagierenden StK-Zellen ändert, wenn man die Drüsen durch Pilokarpinreiz zu verstärkter Sekretion anregt. Aus diesem Grunde führte ich den Baker-Test an Stanniusschen Körperchen durch, die 10 Std. vor der Tötung mit Pilokarpin belastet worden waren. Das Ergebnis dieses Versuches ist, dass alle Zellen der StK negativ reagieren, während die Zellen der Nierentubuli blaugefärbte Granula enthalten(Abb. 37).

Der Versuch, mit Hilfe der Schultz-Reaktion Steroide nachzuweisen, hatte ein negatives Resultat. Ich beobachtete in den Zellen der StK weder rote noch blaurote Farbtöne.

D. Besprechung der Ergebnisse

a) Morphologie und chemische Zusammensetzung der Stanniusschen Körperchen

Wie meine Untersuchungen gezeigt haben, bestehen die Stanniusschen Körperchen bei Flussaalen aus einer Anzahl solider Zellstränge, die aus einem ein- bis mehrschichtigen Epithel bestehen. Viele Autoren vermuten, dass die Epithelzellen Drüsenzellen sind. Jedoch ist ein Beweis dafür noch nicht e bracht. Nach Gabe und Arvy (1961) sind Drüsenzellen u.a. durch ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum, das meist im basalen Teil der Zelle liegt, eine grosse Anzahl von Mitochondrien und einen wohl ausgebildeten Golgi - Apparat charakterisiert. Diese morphologischen Kriterien treffen auf die Zellen der StK zu. Zudem enthalten die Zellen grosse Granula, die, wie Bobin (1949) vermutet und wie meine Untersuchungen zeigen, als Sekretgranula gedeutet werden müssen.

Von grossem Interesse, wie weiter unten ausgeführt wird, ist der Golgi - Apparat der StK-Zellen. Er ist offenbar zur Kondensation von Sekretgranula befähigt. Die zahlreichen Vesikel, die an den Enden der Golgi - Zisternen liegen (s. S. 8), stammen vielleicht vom Golgi - Apparat, vielleicht von in der Nähe liegenden Ergastoplasmasträngen. Es fällt auf, dass die Golgi - Zisternen bei osmiumfixiertem Material kürzer als bei permanganatfixiertem sind (s. S. 8). Rosenbluth (1963) fand in Spinalganglien der Kröte nach Osmiumtetroxid-Fixierung Vesikel, nach Kaliumpermanganat-Fixierung Membranen. Er nimmt an, dass die Membranen während der OsO_4 - Fixierung zerbrechen und sich zu Vesikeln neu ordnen. Möglicherweise ist in den StK-Zellen die unterschiedliche Länge der Golgi - Zisternen nach Permanganat- und Osmium-Fixierung auf ähnliche, zur Zeit noch unbekannte Vorgänge während der Fixierung zurückzuführen.

Stanniussche Körperchen enthalten eine grosse Anzahl von Mitochondrien. Die meisten von ihnen liegen im Aussenteil der Zelle, also dort, wo man Anhäufungen von Sekretgranula beobachtet. Wie die Untersuchungen an pilokarpingereizten StK zeigen, verringert sich bei der Bildung der Sekretgranula die Anzahl der Mitochondrien (s. S.19). Offensichtlich werden sie " verbraucht " und abgebaut. Es ist deshalb zu vermuten, dass auch in ungereizten Drüsenzellen bei der Sekretbildung Mitochondrien verbraucht werden. Dieses macht eine stete Neubildung von Mitochondrien notwendig. Meine Untersuchungen an pilokarpingereizten Drüsen zeigen tatsächlich, dass Mitochondrien aus dem Mittel- und Innenteil der Zelle in den Aussenteil einwandern (s. S.19). In ungereizten Drüsenzellen habe ich die als Entwicklungsstadien von Mitochondrien gedeuteten Gebilde (s.S.9) im mittleren Teil der Zelle gefunden.

In der Literatur wird zwischen einem granulären, d.h. mit Ribosomen besetzten, und einem agranulären endoplasmatischen Retikulum unterschieden. Die granuläre Form findet man besonders häufig in proteinsynthetisierenden Zellen, z. B. im Pankreas (Siekevitz und Palade 1959) und in der Thyreoidea (Wissig 1963). Agranuläres endoplasmatisches Retikulum findet man häufig in steroidproduzierenden Zellen, z. B. in den Testes des Opossum (Christensen und Fawcett 1961) und in säureproduzierenden Magenzellen (Sedar 1961).

Agranuläres endoplasmatisches Retikulum habe ich in ungereizten StK-Zellen nie gefunden, wohl aber ein gut entwickeltes, mit Ribosomen besetztes ER. Ausserdem liegt eine Fülle von Ribosomen frei im Cytoplasma (s.S.8). Da allgemein der grösste Teil der Gesamt-RNS einer Zelle an Ribosomen gebunden ist, lässt sich zunächst vermuten, dass die Stanniusschen Körper viel RNS und möglicherweise viel Protein enthalten. Meine chemischen Untersuchungen an StK ergaben tatsächlich einen hohen Gehalt an RNS (Tabelle 3), der mit dem des Ratten- und Kaninchenpankreas (Davidson 1960) vergleichbar ist. Der Proteingehalt in den StK ist dagegen unerwartet gering (Abb. 17, Tab. 1). Die chemischen Untersuchungen zeigen ferner, dass die in Alkohol, Chloroform und

Äther lösliche Fraktion aus den StK grösser als die der Leber und Niere ist(Abb. 17, Tab. 1). Obgleich anzunehmen ist, dass diese Fraktion noch verhältnismässig viel Wasser enthält, lässt sich, da alle Organe unter den gleichen Bedingungen getrocknet wurden, vermuten, dass die StK besonders reich an alkohllöslichen Substanzen, also Lipiden sind.

Davidson (1960) beschreibt den DNS-P- und RNS-P-Gehalt einiger Säugetierorgane und bildet den Quotienten aus beiden. Ein hoher Quotient gibt an, dass viel RNS im Vergleich zu DNS vorhanden ist. Bei Säugetierpankreas und -leber, die viel RNS enthalten, liegt der Quotient zwischen 5 und 8. Bei anderen Organen, z. B. Niere, Gehirn und Knochengewebe liegt er um 1 oder darunter. Allgemein lässt sich sagen, dass ein hoher Quotient bei Organen zu erwarten ist, die einen hohen Eiweissstoffwechsel haben.

Vergleicht man den von Davidson angegebenen Quotienten mit dem von mir ermittelten, so zeigt sich, dass das Verhältnis RNS-P : DNS-P der StK und der Aalleber etwa so gross ist wie das der Säugerleber und des -pankreas (Tab. 4). Davidson gibt für den Quotienten bei der Rattenniere den Wert 0.7 an. Bei der Aalniere liegt er zwischen 1.03 und 1.56 (Tab. 4), ist also dem der Rattenniere ähnlich. Auffällig ist, dass der absolute Gehalt an DNS-P in der Aalniere sehr gross ist. Vielleicht ist dieses darauf zurückzuführen, dass die Niere bei Fischen ein wichtiges blutbildendes Organ ist, in dem viel DNS synthetisiert wird.

Bildet man das Verhältnis von Rest-Fraktion (Protein) : DNS-P, so ist der Wert für die Leber etwa doppelt so gross wie für die StK (Tab. 4), was auf den geringen Proteingehalt der letzteren zurückzuführen ist. Der Quotient der Niere hat ebenfalls einen niedrigen Wert, er jedoch ist auf den hohen Gehalt an DNS zurückzuführen.

Der Quotient Rest-Fraktion (Protein) : RNS-P zeigt, dass der Proteingehalt im Verhältnis zum RNS-Gehalt bei den StK sehr gering ist (Tab. 4). Wesentlich höher ist er bei der Leber und Niere.

Von Interesse wäre es, das Verhältnis von Lipiden : DNS-P zu kennen. Da jedoch die Alkohol-Chloroform-Äther-Fraktion neben Lipiden zweifellos auch Wasser enthält, ist die Berechnung dieses Quotienten nicht sinnvoll.

Die qualitativen Untersuchungen des lipidhaltigen Extraktes ergaben, dass er Komponenten enthält, die als Gruppen in Phophatiden vorhanden sind, wie z. B. Phophat, primäre und wahrscheinlich auch quartäre Amine (Tab. 5). Ich habe jedoch keine quantitativen Untersuchungen hierüber durchgeführt, die weitere Aussagen erlauben würden.

Steroide konnte ich mit Toluolsulfonsäure nicht nachweisen (Tab. 5).

b) Sekretionsmechanismus

Im Gegensatz zu früheren Autoren (Pettit 1896, Bobin 1949, Olivereau 1961) habe ich festgestellt, dass die Drüsenstränge der StK kein Lumen besitzen (s. S. 5). Auch finden im Drüsenepithel kaum Mitosen statt. Deshalb können die StK auch nicht im Sinne Bobins holokrin sezernieren. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an ungereizten StK zeigen, dass sämtliche Zellen etwa gleich viele und gleich grosse Sekretgranula, Mitochondrien und ER-Zisternen sowie etwa die gleiche Anzahl Ribosomen enthalten. Eine Antwort auf die Frage, wie die Drüsen ihr Sekret bereiten und sezernieren, ist durch sie nicht zu erhalten. Die pilokarpingereizten StK unterscheiden sich von ungereizten dadurch, dass man in ihnen Zellen findet, die keine, andere, die kleine und wiederum andere, die grosse Sekretgranula enthalten, weil sie durch den Reiz ihre Arbeitsweise ändern und nicht mehr kontinuierlich, sondern rhythmisch ihr Sekret bilden (s. S. 18 sowie Ristow und Piepho 1963). Benachbarte gereizte Zellen befinden sich also in verschiedenen Stadien der Sekretbildung. Das erleichtert die Untersuchung des Sekretbildungsmechanismus im hohen Masse.

Die Versuche von Siekevitz und Palade (1958, 1959, 1960 a, 1960 b, 1962) zeigen, dass im Meerschweinchenpankreas die Verdauungsenzyme in oder an Ribosomen, die Membranen anhaften, sythetisiert werden. Die Enzyme wandern anschliessend durch die ER-Zisternen zum Golgi - Apparat und werden dort kondensiert. Kondensation von Sekreten im Golgi - Apparat wurden auch in anderen Drüsenzellen beobachtet (Scharrer und Brown 1961, Afzelius und Fridberg 1963, Zusammenfassung s. Hirsch 1962). Unter Reizbedingungen können Sekretgranula des Pankreas auch in Ergastoplasma-Zisternen kondensieren (Palade 1956). Solche intrazisternalen Granula hat man nicht nur im Meerschweinchen-, sondern auch im Rattenpankreas beobachtet (Ekholm, Edlund und Zelander 1962). Ekholm et al., die intrazisternale Granula nach Ethioninga~ feststellten, werten sie als Zeichen einer gestörten Enzymprotein-Synthese.

In den StK habe ich keinen direkten Zusammenhang zwischen Ergastoplasma- und Golgi - Zisternen gefunden. Allerdings liegen zwischen Ergastoplasma- und Golgi-Feld viele Vesikel, die vielleicht von ER-, vielleicht von Golgi-Zisternen abgespalten werden. Bilder von ungereizten und gereizten StK (s. S.8 und S.19) zeigen, dass Sekretgranula im Golgi-Apparat kondensiert werden. Darüber hinaus habe ich auch im Aussenteil der Zelle, d. h. fern vom Golgi-Apparat eine Kondensation von Sekret beobachtet: 300 A grosse und grössere Vesikel füllen sich allmählich mit osmiophiler Substanz, die sich in ihrer elektronenmikroskopischen Dichte nicht von der grosser Sekretgranula unterscheidet (s. S. 18). Diese Vesikel gehen möglicherweise aus kleineren (160 A) hervor. Ausser den geschilderten beiden Möglichkeiten, Sekretgranula zu bilden, konnte eine weitere dritte Möglichkeit beobachtet werden. Wie beschrieben, findet man im Aussenteil der Zelle oft inselartige Ansammlungen 160 A grosser Partikel, die sich in Form und Anfärbbarkeit nicht von Ribosomen unterscheiden (s. S.19), im Gegensatz zu diesen jedoch gegen RNase-Behandlung resistent sind (s. S.20). Diese Partikel können zu Sekretgranula verschmelzen. Die kleinsten Verschmelzungs-

produkte sind noch nicht, die grösseren teilweise oder ganz von einer Membran umgeben. Wir wissen zur Zeit nicht, warum in den Zellen der Stanniusschen Körperchen an drei Orten Sekret kondensiert wird. Vielleicht lässt sich die Bildung von Sekretgranula im Aussenteil der Zelle als Zeichen einer gestörten Sekretsynthese durch den Pilokarpinreiz auffassen, ähnlich also, wie es Ekholm, Edlund und Zelander (1962) im Fall der intrazisternalen Granula im Rattenpankreas getan haben.

Auf die Frage, auf welche Weise in den Stanniusschen Körperchen Sekret synthetisiert wird, ist mit morphologischen Methoden keine Antwort zu erhalten. Dennoch lässt sich vermuten, dass Ribosomen bei der Sekretbildung eine Rolle spielen. Ribosomen erscheinen im ultradünnen Schnitt als einheitlich runde Partikel. Man weiss jedoch seit einiger Zeit (Tissières und Watson 1959, Huxley und Zubay 1960), dass sie aus einer Reihe von Untereinheiten bestehen, die sich elektronenmikroskopisch mit der negative-staining-Technik darstellen lassen.

Die offensichtlich artifiziellen Ribosomen in den Schnitten von Stanniusschen Körperchen (s. Abb. 22) zeigen strukturelle und färberische Unterschiede, die aller Wahrscheinlichkeit nach physiologisch bedingt sind. So lassen sich nebeneinander 160 A grosse stark und schwach anfärbbare Partikel finden. Einige erscheinen kompakt, andere diffus, wiederum andere haben einen hellen Innenhof. Die letzteren sind besonders dort zu finden, wo kleine Sekretgranula entstehen. Kompakte Ribosomen sind an solchen Orten seltener. Möglicherweise entstehen die Partikel mit einem hellen Innenhof und die Bildung von Sekretgranula im Zusammenhang.

Einige Autoren beobachteten in anderen Geweben ebenfalls ribosomenartige Gebilde mit einem Innenhof, sog. vesikuläre Ribosomen. So fanden Siekevitz und Palade (1960), die Ribosomenfraktionen vom Pankreas mit Pyrophosphat

behandelten, vesikuläre Ribosomen. Sie meinten, dass Ribosomen ein strukturelles Proteingehäuse haben, in dem sich RNS bzw. die an ihr gebildeten Proteine befinden. Kurosumi (1957) und Kurosumi et al. (1958), die Seeigeleier untersuchten, stellten die Hypothese auf, dass sich kompakte Ribosomen zu Vesikeln umformen, die sich ausdehnen und zu ER-Strängen heranwachsen.

Experimentell habe ich in den Zellen der StK Ribosomen durch RNase-Behandlung zu Partikeln mit einem hellen Innenhof abbauen können (s. S. 20). Sie ähneln denen, die man in unbehandelten Drüsen in der Nähe kleiner Sekretgranula findet. Mir scheint es deshalb berechtigt zu sein, die in ultradünnen Schnitten an pilokarpingereizten Stanniusschen Körperchen gefundenen vesikulären Ribosomen als Abbaustadien kompakter Ribosomen zu deuten. Völlig offen bleibt, welche Vorgänge sich bei einem solchen Abbau abspielen. Wenig wahrscheinlich ist, dass RNS abgebaut wird, da meine autoradiographischen Untersuchungen deutlich zeigen, dass nur wenig H^3 - Cytidin in die StK eingebaut wird (s. S.23).

160 A grosse Partikel, die in grosser Anzahl inselartig in elektronenmikroskopischen Bildern gereizter StK zu beobachten sind (s. Abb. 24, 25), lassen sich nicht mit Ribonuklease angreifen, denn man findet nur vereinzelt vesikuläre Partikel (s. Abb. 28). Die nicht angreifbaren sind möglicherweise keine Ribosomen, sondern Syntheseprodukte, die an Ribosomen gebildet worden sind. Dafür spricht, dass sich solche Partikel zusammenlagern und schliesslich von einer Membran umgeben werden; sie unterscheiden sich dann nicht mehr von Sekretgranula. Man kann also vermuten, dass das Sekret oder Bestandteile des Sekretes an Ribosomen synthetisiert werden. Leider ist es zur Zeit nicht möglich, die an Ribosomen von Stanniusschen Körperchen gewonnenen Ergebnisse mit den modernen Vorstellungen über Proteinsynthese an Ribosomen (z. B. Gierer 1963) in Einklang zu bringen.

Bei der Bildung von Sekret spielen weitere Zellorganellen eine Rolle. So habe ich beobachtet, dass zu Beginn des Sekretbil-

dungszyklus, dann nämlich, wenn noch keine Sekretgranula in der Zelle vorhanden sind, ein reichliches parallel angeordnetes Ergastoplasma existiert (s. S. 18). Treten erste Sekretgranula auf, so lockert sich die parallele Anordnung, die Ergastoplasmastränge zerreissen, und ihre Anzahl nimmt ab. Gleichzeitig vermindert sich die Ribosomenanzahl. Abb. 20 zeigt deutlich den Unterschied zwischen ER-Strängen einer Zelle ohne und mit kleinen und grossen Sekretgranula. In Abb. 23 sieht man möglicherweise den Beginn einer Auflösung von ER-Zisternen. Die von Porter (1961) für viele Organe beschriebene Kontinuität des ER ist eventuell auch in StK-Zellen mit parallel angeordneten Ergastoplasmasträngen vorhanden. Später jedoch, d. h. wenn Sekretgranula gebildet worden sind, besteht sie sicher nicht, weil das ER zerrissen ist. Ob alles ER sich von der äusseren Kernmembran abfaltet oder ob im Cytoplasma zunächst ein angranuläres ER entsteht, wie es Abb. 27 vermuten lässt, kann ich nicht entscheiden.

Bei der Bildung von Sekretgranula spielen auch Mitochondrien eine Rolle. Diese wandern vom Mittel- und Innenteil der Zelle in den Aussenteil. Ihre Anzahl nimmt ab, je mehr sich die Zelle mit Sekretgranula füllt (s. Abb. 20).

Wie das Sekret geschüttet wird, liess sich nicht beobachten. Nur in einem Fall sieht es so aus, als ob ein Sekretgranulum, dessen osmiophile Substans diffus begrenzt ist, in dem Zwischenraum zwischen zwei Grenzmembranen liegt. Ich nehme an, dass normalerweise das Sekret in eine lösliche Form gebracht wird und unsichtbar die Zellgrenzmembran passiert. Dafür spricht, dass die osmiophile Substans grosser und offensichtlich reifer Granula gleichsam angenagt erscheint. Der Abbau dürfte schnell vor sich gehen, da solche angenagten Granula nicht häufig zu finden sind. Abb. 27 zeigt eine Zelle, die grosse, leere Vakuolen enthält. Es ist zu vermuten, dass sie gerade ihr Sekret geschüttet hat.

Zusammenfassend möchte ich den Sekretbildungszyklus der Stanniusschen Körperchen nach Pilokarpinreizung folgendermassen beschreiben : Zunächst bildet die Zelle ein reiches,

mit Ribosomen besetztes endoplasmatisches Retikulum. Aus dem Mittel- oder Innenteil der Zelle wandern Mitochondrien zwischen die ER-Stränge im Aussenteil. Dabei wird deren ursprünglich parallele Anordnung aufgelockert. Zwischen den Ergastoplasmamembranen entstehen kleinere und grössere Vesikel, die allmählich osmiophile Substanz einlagern. Im Bereich inselartiger Ansammlung 160 A grosser Partikel können sich ebenfalls Sekrete kondensieren, die später von einer Membran umgeben werden und zu grossen Sekretgranula heranwachsen. Im Mittelteil der Zelle bilden sich Granula im Golgi-Feld. Je grösser die Sekretgranula werden, desto geringer wird die Anzahl der Ergastoplasmastränge und Mitochondrien. Bei der Sekretbildung spielen vermutlich Ribosomen eine Rolle. Die Drüsenzellen sezernieren wahrscheinlich merokrin (Typ IV, Kurosumi 1961). Eine Holosekretion habe ich nicht beobachtet.

Die Vorstellungen über den Sekretionsmechanismus an pilokarpingereizten StK lassen sich nicht ohne weiteres auf die ungereizte Drüse übertragen. Man muss vielmehr annehmen, dass viele Schritte bei der Sekretbereitung in ungereizten Drüsenzellen anders ablaufen als in gereizten. So bilden ungereizte ihre Sekretgranula kontinuierlich, gereizte dagegen rhythmisch. Auch werden in ungereizten offensichtlich nur im Bereich des Golgi-Apparates Sekretgranula kondensiert, in gereizten dagegen auch im Aussenteil der Zelle. Trotz dieser Verschiedenheit lässt sich vermuten, dass das Sekret oder Teile davon in der ungereizten Zelle wie in der gereizten an Ribosomen gebildet wird. Weitere Aufschlüsse über den Sekretionsmechanismus ungereizter Zellen geben uns die autoradiographischen Versuche mit H^3 - Leucin (s.S. 21). Diese zeigen, dass 45 Min. nach der H^3 - Leucin - Injektion radioaktive Substanzen diffus in der Zelle verteilt sind. 90 Min., 2 Std. und 4 Std. nach der Injektion ist eine Ansammlung von Silberkörnern in Kernnähe zu beobachten. Zunächst vermutete ich, dass sie über dem Golgi - Apparat liegt, da dieser zur Kondensation von Sekretgranula und nach Ansicht mancher Autoren (Übersicht s. Hirsch 1962) zur Bildung von Membransystemen befähigt ist. Die elektronenmikroskopisch von mir unter-

suchten Autoradiogramme zeigen dagegen, dass die Silberkornanhäufungen über Vesikeln liegen, die sich vielleicht von Golgi - oder Ergastoplasma - Zisternen gelöst haben (s. S. 22). Natürlich ist es nicht möglich, aus der elektronenmikroskopischen Untersuchung dieser Autoradiogramme weitreichende Schlüsse zu ziehen. Von weiteren Untersuchungen mit dieser Methode sind aber wertvolle Aufschlüsse über den Sekretionsmechanismus zu erwarten.

7 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion lassen sich lichtmikroskopisch Silberkornanhäufungen über dem Aussenteil der Zelle erkennen. In ihm liegen die meisten Sekretgranula und Membranen. Es lässt sich nicht entscheiden, ob das markierte H^3 - Leucin in die Sekretgranula oder in die Membran-Systeme eingebaut ist. Auffälligerweise sind zu dieser Zeit Ansammlungen von Silberkörnern in Kernnähe selten. 12 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion liegen die Silberkörner über den meisten Zellen gleichmässig verteilt. Nur bei wenigen beobachtet man über dem Aussenteil Silberkornansammlungen. Es ist zu vermuten, dass die ersteren ihr Sekret bereits geschüttet haben, die letzteren noch nicht. Sehr vereinzelt lassen sich Zellen mit Silberkornanhäufungen in Kernnähe beobachten. Solche Zellen haben möglicherweise erneut mit der Bildung von Sekret begonnen.

Nimmt man an, dass H^3 - Leucin in das Sekret eingebaut wird, so lässt sich aufgrund der autoradiographischen Versuche aussagen, dass die injizierte radioaktive Aminosäure etwa 7 - 12 Std. in der Zelle bleibt und danach mit dem Sekret die Zelle verlässt. Das bedeutet, dass der Sekretionszyklus in der nicht durch Pilokarpin gereizten Drüse etwa 7 - 12 Std. dauert.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig , dass ich niemals über dem " Lumen " Bobins (1949) Ansammlungen von Silberkörnern gefunden habe. Wenn man annimmt, dass H^3 - Leucin in das Sekret eingebaut wird, wären Silberkornansammlungen gerade dort zu erwarten gewesen, da die Autorin eine Holosekretion in das Lumen vermutet.

In vitro scheint der Einbau der Aminosäure in gleicher Weise vor sich zu gehen wie in vivo, wie die Versuche an isolierten Stanniusschen Körperchen zeigen. Dieses bedeutet, dass zunächst die Silberkörner diffus über der Zelle erscheinen, sich später in Kernnähe und noch später im Aussenteil der Zelle konzentrieren.

c) Beschaffenheit des Sekrets

Im Zusammenhang mit der Sekretbildung der Stanniusschen Körperchen ist es von grosser Wichtigkeit zu wissen, von welcher chemischen Beschaffenheit das Sekret ist. Untersuchungen darüber sind von verschiedenen Autoren angestellt worden. Ihre Ergebnisse widersprechen sich. Bobin (1949) kam aufgrund histologischer Untersuchungen zu der Ansicht, dass die Sekretgranula Lipoproteine enthalten. Fontaine und Leloup-Hatey (1959) fanden in den StK Hydrocortison. Sie vermuten, dass sie Steroide sezernieren. Mit histochemischen Methoden fand dagegen Rasquin (1956) in den StK von Astyanax mexicanus einen hohen Gehalt an Phospholipiden. Sie stellte darüber hinaus nach Belastung ihrer Fische mit Wasser und gelöstem Vasopressin (Pitressin) sowie nach Gaben von Desoxycorticosteron-acetat eine Vermehrung der Phospholipidgranula in den Zellen fest. Nach Injektion von Kaliumchlorid und ungelöstem Vasopressin sowie nach Einsetzen der Tiere in eine 1 %ige Natriumchlorid-Lösung verminderte sich die Anzahl der Granula.

Ich führte den Phosphatidnachweis an den StK des Flussaales wie Rasquin mit dem Baker-Test durch (s. S. 24). Dieser Test ist angeblich spezifisch, sofern die notwendigen Kontrollversuche durchgeführt werden (Lipp 1960). In meinen Versuchen reagierten einige StK-Zellen positiv, was für einen hohen Phosphatidgehalt in diesen Zellen spricht. In Rasquins Versuchen reagierten jedoch, soweit dieses aus den Bildern der Autorin zu entnehmen ist, nicht einige wenige Zellen, sondern die meisten positiv. Ich kann aus dem Ergebnis meines Versuches nicht schliessen, dass die negativ reagierenden Zellen keine Phosphatide enthalten, vielmehr ver-

mute ich, dass hier die Phosphatide maskiert, d. h. mit viel Protein verknüpft sind. Solche Maskierung von Lipiden ist bei vielen Geweben beschrieben worden (Bachmann 1954, Krauter 1958, Lipp 1960). Meine Vermutung wird dadurch gestützt, dass ich in pilokarpingereizten, also zu verstärkter Sekretproduktion angeregten Zellen, keine positive Reaktion gefunden habe.

Für die Lipidnatur des Sekretes spricht ferner, dass die Sekretgranula zwar von OsO_4, nicht aber von $KMnO_4$ fixiert werden (s. S. 10)., denn Afzelius (1962) u. a. sind der Meinung, dass $KMnO_4$ Proteine, nicht aber Lipide fixiert. Einen weiteren Hinweis geben meine chemischen Untersuchungen. Sie zeigen, dass die lipidhaltige Fraktion besonders gross ist. Lichtmikroskopisch lassen sich in mit Aethanol entwässerten Präparate keine Sekretgranula erkennen, es sei denn, die Objekte wurden mit OsO_4 fixiert.

Ein weiteres Ergebnis deutet einerseits auf die Lipidnatur des Sekrets, andererseits aber auch auf die Anwesenheit von Proteinen. So haben die StK einen ausserordentlich hohen Eiweissstoffwechsel, der sich weiter erhöht, wenn man sie durch Pilokarpin zur Sekretion anregt (s. S. 22). Ferner deuten die oben beschriebenen (s. S. 24) und eben diskutierten histochemischen Versuche an gereizten StK darauf hin, dass Phosphatide maskiert, d.h. an Protein gebunden, vorliegen. Wenn man annimmt, dass bei Extraktion mit organischen Lösungsmitteln nicht nur Lipide, sondern auch die mit ihnen verknüpften Proteine herausgelöst werden, so lässt sich verstehen, dass die aus den StK von mir isolierte proteinhaltige Fraktion klein ist (s. Tab. 1).

Nach Lipp beweist ein negatives Ergebnis der Schultz-Reaktion (s. Tab. 1) nicht unbedingt das Fehlen von Steroiden, so dass ich aus meinem negativen Ergebnis (s. S.25) nicht den Schluss ziehen kann, in den StK seien keine oder nur wenige Steroide vorhanden. Mein Ergebnis stimmt jedoch mit dem negativen der Tüpfelprobe mit Toluolsulfonsäure (s. Tab. 5), ferner mit den Befunden verschiedener Autoren (Ford 1959,

Phillips und Mulrow 1959) überein, die papierchromatographisch keine Steroide in den StK nachweisen konnten.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund meiner Untersuchungen vermuten, dass das StK-Sekret Phosphatide enthält, die mit Proteinen verknüpft sind. Endgültig ist das Problem der chemischen Beschaffenheit des Sekrets allerdings nur mit anderen Methoden, z. B. durch Isolierung von Sekretgranula mit anschliessend chemischer Untersuchung, zu lösen.

d) Stoffwechsel der Stanniusschen Körperchen

Seit der Entdeckung der StK wurde verschiedentlich versucht, ihre Funktion aufzuklären. Vincent (1898) unternahm erste Exstirpationsexperimente. Die Tiere überlebten lange Zeit, ohne sichtbare Ausfallserscheinungen zu zeigen. Ristow und Piepho (unveröffentlicht) konnten diese Versuche bestätigen.

Rasquin vermutete aufgrund histochemischer Untersuchungen in den Stanniusschen Körperchen " the presence of a special mechanism antagonistic to the antidiuretic hormone in teleosts ...." (Rasquin 1956, S. 407). Anderen Autoren war es nämlich nicht möglich, durch Vasopressin eine antidiuretische Wirkung bei Knochenfischen hervorzurufen.

Ristow und Piepho (unveröffentlicht) ergänzten die Versuche Rasquins. Sie injizierten Flussaalen Wasser und Lysin-Vasopressin und fanden einen Anstieg der Diurese. Danach wirkt das Hormon beim Aal nicht wie bei höheren Wirbeltieren antidiuretisch, sondern diuretisch. Anderen Flussaalen exstirpierten die beiden Autoren die StK und injizierten ihnen danach Wasser oder Wasser mit Vasopressin. Die Tiere gaben zunächst eine kleine Menge der injizierten Flüssigkeit ab, nahmen dann jedoch Wasser aus der Umgebung auf, wurden ödematisch und starben meistens. Wichtig ist, dass Aale, die nach Exstirpation nur mit Wasser belastet worden waren, weniger Flüssigkeit abgaben als solche, die zusätzlich Vasopressin erhalten hatten. Dieser Versuch zeigt, dass Vasopressin beim Aal auch dann

diuretisch wirkt, wenn die Stanniusschen Körperchen fehlen. Aalen, denen diese Untersucher die StK exstirpiert hatten, wurden für etwa 14 Tage in Meerwasser und anschliessend in Süsswasser gesetzt. Sie überlebten ohne sichtbare Ausfallserscheinungen. Die Funktion der StK ist hiernach weiter ungeklärt.

Es stellt sich nun die Frage, ob die StK überhaupt eine Funktion haben. Versuche, in denen nur eine der beiden Drüsen exstirpiert wurde (Pettit 1896, Ristow und Piepho unveröffentlicht) zeigen, dass das in situ verbliebene StK stark hypertrophiert. Dieses deutet darauf hin, dass die StK eine Bedeutung für den Organismus haben.

Es schien mir aus diesem Grund wichtig zu sein, zunächst Untersuchungen zum Stoffwechsel der StK durchzuführen, um zu erfahren, ob es sich um stoffwechselaktive oder -träge Organe handelt. Ausserdem interessierte die Reaktion der StK auf Pilokarpin. Ich führte deshalb Parallelversuche durch, in denen die StK vor einer H^3 - Leucin- oder H^3 - Cytidin - Injektion mit Pilokarpin gereizt wurden.

In der Annahme, dass an allen Orten, an denen Eiweisssynthese stattfindet, die mittlere spezifische Aktivität der freien Aminosäure gleich ist, kann die autoradiographische Schwärzung als ein direktes Mass für die Grösse der lokalen Aminosäureumsatzrate eines Organes gelten (Maurer 1959). Ausserdem lassen sich unter dieser Annahme die Aminosäureumsatzraten einzelner Organe miteinander vergleichen. Die inkorporierten Aminosäuren werden offenbar in Eiweiss eingebaut (Schultze, Oehlert und Maurer 1960). Gleiches gilt für die Inkorporation von RNS-Vorstufen, wie z. B. H^3 - Cytidin. Auch hier kann die autoradiographische Schwärzung nach Oehlert (1961) als Mass für die lokale Neubildungsrate der RNS gelten. Aus der autoradiographischen Schwärzung über den StK, der Leber und der Niere des Flussaales aufgrund einer H^3 - Leucin - bzw. H^3 - Cytidin - Inkorporation lassen sich also Rückschlüsse auf die Intensität des Eiweiss- bzw. Nukleinsäurestoffwechsels der Organe ziehen.

Die Versuche mit H^3 - Leucin machen in den StK einen Eiweissumsatz deutlich, der grösser als in der Leber und Niere von Aalen ist (s. S.21). Seine unvermutete Höhe ist sicherlich auf die sekretorische Leistung der StK zurückzuführen. Für diese Deutung spricht, dass die lokale Aminosäureumsatzrate nach Pilokarpinreiz verdoppelt wird, während sich der Eiweissumsatz der Leber und Niere nicht verändert. In vitro regt dagegen Pilokarpin die Drüsen nicht zu verstärktem Einweissumsatz an (s. S.22).

Ich habe im H^3 - Leucin - Versuch darauf verzichtet, den Quotienten $\frac{Sk\ Cyt}{Sk\ K}$ zu bilden, da es sehr schwierig ist, lichtmikroskopisch zu entscheiden, ob die Silberkörner über den Kernen oder dem Cytoplasma liegen.

H^3 - Cytidin wird nicht nur in Ribonukleinsäure, sondern auch in Desoxyribonukleinsäure eingebaut. Oehlert(1961) injizierte Mäusen RNS-Vorstufen und untersuchte Autoradiogramme von Organen, die er mit Ribonuklease behandelt hatte. Organe, wie Leber und Pankreas, waren nicht, andere dagegen, in denen lebhafte Zellteilungen ablaufen und im Zusammenhang damit DNS synthetisiert wird, waren deutlich markiert. In den StK und in der Leber des Flussaales finden nur wenige Zellteilungen statt. Man kann deshalb annehmen, dass das gesamte injizierte H^3 - Cytidin in die Ribonukleinsäure eingebaut wird. Unsicher dagegen ist, ob in der Niere, die bei Fischen ein wichtiges blutbildendes Organ darstellt, und in der ich mit chemischen Methoden einen hohen DNS-Gehalt gefunden habe, H^3 - Cytidin nur in die RNS eingebaut wird. Möglicherweise deuten die extrem stark markierten Zellen der Niere auf einen Einbau in die DNS.

Die statistische Auswertung der Autoradiogramme des mit H^3 - Cytidin behandelten Tieres ergab, dass die Silberkorndichte über den StK überraschenderweise geringer als über der Leber (s. S.23) ist. Noch geringer ist sie über den StK des mit Pilokarpin und anschliessend mit H^3 - Cytidin behandelten Aales. Die Leber und Niere beider Tiere unterscheiden sich dagegen nicht (s. S.24).

Seit den Arbeiten von Caspersson (1941) und Brachet (1942) weiss man, dass eine direkte Beziehung zwischen der biologischen Eiweissynthese und den Nukleinsäuren besteht, was Ficq und Brachet (1956) und Niklas und Oehlert (1956) bestätigten. Danach ist der Eiweissumsatz proportional dem RNS-Gehalt der Organe. Es gibt jedoch eine bemerkenswerte Ausnahme, nämlich das exokrine Pankreas, das eine ungewöhnlich hohe Proteinsynthese hat. Über ihm liegen nach H^3 - Leucin - Injektion viele Silberkörner, jedoch nur relativ wenige nach H^3 - Cytidin - und H^3 - Uridin - Injektion (Schultze, Oehlert und Maurer 1961). Das gleiche gilt für das durch Pilokarpin gereizte Pankreas (Stöcker 1962). Bei anderen eiweissynthetisierenden Zellen ist dagegen die relative Silberkorndichte nach H^3 - Cytidin- und H^3 - Leucin - Injektion etwa gleich (Schultze, Oehlert und Maurer 1961).

Ich habe die von mir ermittelten Silberkornzahlen über den Stanniusschen Körperchen und der Leber von Flussaalen nach H^3 - Leucin- und H^3 - Cytidin- Injektion in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

Silberkorndichte
pro Zelle von Leber und Stanniusschen Körperchen beim Flussaal, umgerechnet auf einen Tag Expositionszeit.
Die Tiere wurden 90 Min. nach der Injektion getötet.

Gewebe	H^3 - Leucin	H^3 - Cytidin
Leber	0,3	0.85
StK	1.4	0.65
StK (gereizt)	3.1	0.15

Setzt man die gefundenen Werte für die Leber = 100, so ergeben sich Werte für die relative Silberkorndichte, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind.

Tabelle 7

Relative Silberkorndichte
Über der Leber und den Stanniusschen Körperchen des Flussaales nach H^3 - Leucin- und H^3 - Cytidin - Injektion.
Die Tiere wurden 90 Min. nach der Injektion getötet.

Gewebe	H^3 - Leucin	H^3 - Cytidin
Leber	= 100	= 100
StK	465	75
StK (gereizt)	1000	18

Zum Vergleich gebe ich in Tabelle 8 einige Werte an, die Schultze, Oehlert und Maurer (1961,S. 37) zusammengestellt haben.

Tabelle 8

Relative Silberkorndichte
über verschiedenen Geweben auf Autoradiogrammen von Organen der Maus nach Injektion markierter Aminosäuren und RNS - Vorläufern (Schultze, Oehlert und Maurer 1961, S. 37, vereinfacht).

Gewebe	H^3 - Leucin	H^3 - Cytidin
Pankreas-Epithelien	440	150
Epithelien (Dünndarm)	410	440
Leber	= 100	= 100
Nebennierenrinde	234	280
Nebennierenmark	84	92

Vergleicht man die Werte aus Tabelle 8 mit den von mir gefundenen (Tabelle 7), so stellt man eine Ähnlichkeit zwischen der Silberkorndichte über Pankreas und Stannius-

schen Körperchen fest. Über beiden Organen ist die relative Silberkorndichte nach H^3 - Leucin - Injektion wesentlich höher, nach H^3 - Cytidin - Injektion jedoch geringer als über der Leber. Offensichtlich hat die schwache Markierung nach H^3 - Cytidin - Injektion zumindest bei den StK eine funktionelle Bedeutung, denn sie ist nach Pilokarpinreiz noch geringer, während sie nach H^3 - Leucin - Injektion wesentlich erhöht ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die Silberkorndichte über dem Cytoplasma pilokarpingereizter höher ist als über dem ungereizter Drüsenzellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stanniusschen Körperchen einen hohen Eiweissstoffwechsel haben, offensichtlich ein Ausdruck einer hohen sekretorischen Leistung dieser Organe. Eigenartigerweise ist der Einbau von H^3 - Cytidin, einer RNS-Vorstufe, geringer als in die Leber. Er verringert sich weiter, regt man die StK zur verstärkten Sekretion an.

E. Zusammenfassung

Die Stanniusschen Körperchen (StK) bestehen aus kompakten Zellsträngen. Das von verschiedenen Autoren beschriebene zentrale Lumen ist ein Fixierungsartefakt.

Die Zellen ähneln morphologisch anderen Drüsenzellen. Sie besitzen einen grossen Zellkern, ein wohlentwickeltes endoplasmatische Retikulum, das reich mit Ribosomen besetzt ist, einen gut ausgebildeten Golgi-Apparat, viele Mitochondrien und grosse osmiophile Sekretgranula, die im Golgi-Apparat kondensiert werden.

Mitochondrien entwickeln sich wahrscheinlich aus Promitochondrien. Verschiedene Entwicklungsstadien werden beschrieben. Ausserdem scheinen sich Mitochondrien durch Teilung zu vermehren.

Aus den StK wurde eine sehr grosse lipidhaltige, eine nur kleine proteinhaltige Fraktion gewonnen. In der ersteren waren primäre und quartäre Amine und Phosphat, jedoch keine Steroide nachzuweisen. Der RNS-P- und DNS-P-Gehalt der Organe wurde bestimmt.

Pilokarpin regt die StK zu verstärkter Sekretion an. Der pilokarpininduzierte Sekretionszyklus wird im einzelnen beschrieben. Sekretgranula werden in den gereizten StK-Zellen nicht nur im Golgi-Feld, sondern auch in kleinen Vesikeln und aus 160 A grossen Partikeln, die gegen RNase resistent sind, kondensiert.

Autoradiographisch wurde in den ungereizten Zellen nach H^3 - Leucin - Injektion eine Wanderung von radioaktivem Material aus Kernnähe zum äusseren Teil beobachtet. Der Sekretionszyklus der ungereizten StK-Zelle dauert etwa 7 - 12 Std.

Ich führte den Baker-Test zum Nachweis von Phosphatiden durch und fand, dass in ungereizten StK nur einige wenige Zellen, in pilokarpingereizten keine Zellen positiv reagieren. Vermutlich liegen in den letzteren die Phosphatide in maskierter Form vor.

Autoradiographisch habe ich Untersuchungen zum Eiweissstoffwechsel der StK durchgeführt. Ich stellte fest, dass sie einen hohen Eiweissumsatz haben. Dieser erhöht sich, wenn man die StK durch Pilokarpin zur Sekretion anregt. Es wird weniger H^3 - Cytidin in die StK als in die Leber eingebaut. Regt man die Drüsen durch Pilokarpin zu verstärkter Sekretion an, so wird noch weniger eingebaut.

Die Stammzellchen Körperchen sezernieren nicht holokrin, wie wiederholt angenommen wurde, sondern merokrin; ihr Sekret enthält vermutlich Phosphatide, die mit Proteinen verknüpft sind.

F. Material und Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden an Stanniusschen Körperchen von Flussaalen (Anguilla anguilla L.) durchgeführt. Die kleineren Tiere (bis zu 20 cm) stammen aus der Elbmündung, die grösseren aus der Elbe und den Seen Nordwestdeutschlands; sie waren wahrscheinlich alle Steigaale. Ihr Geschlecht war, soweit es sich bestimmen liess, weiblich. Zu den Untersuchungen wurden grundsätzlich nur Tiere herangezogen, die einen gesunden und lebhaften Eindruck machten.

1. Histologische Untersuchungen

Histologische Untersuchungen führte ich an Stanniusschen Körperchen von Aalen, die zwischen 6 und 70 cm lang waren, durch. Die kleinsten Aale waren Glasaale. Die Tiere tötete ich durch Dekapitieren, öffnete ihre Leibeshöhle von der Ventralseite her, entfernte den Darm und präparierte die Stanniusschen Körperchen vorsichtig unter dem Stereo-Mikroskop aus dem Nierenparenchym heraus und fixierte sie anschliessend. Vom Dekapitieren der Tiere bis zum Fixieren der StK vergingen weniger als 4 Min. Bei sehr kleinen Aalen wurden die Stanniusschen Körperchen mit anhängendem Nierengewebe fixiert, um eine Beschädigung der Organe zu vermeiden.

Fixierungsmittel waren 1) das Fixierungsgemisch nach Carnoy, 2) ungepufferte 1 %ige OsO_4 - Lösung und 3) gepufferte 1 %ige OsO_4 - Lösung(Palade 1952). Die nach 1) fixierten Objekte bettete ich in üblicher Weise in Paraffin ein, stellte 3 - 5 µ dicke Schnitte her und färbte diese nach dem Entparaffinieren mit Hämatoxylin-Eosin bzw. mit der Azan-Färbung. Die nach 2) fixierten Objekte bettete ich ebenfalls in Paraffin ein, stellte Schnitte her, die ich ungefärbt mit einem Phasenkontrast-Mikroskop (Zeiss Standard WL) untersuchte. Die nach 3) fixierten Objekte wurde in Methacrylat eingebettet und mit einem Porter-Blum-Mikrotom geschnitten. Die Technik dazu wird weiter unten beschrieben. Die etwa 2 µ dicken Schnitte deckelte ich mit unvorpolymerisiertem Methacrylat ein und untersuchte sie mit dem Phasenkontrast-Mikroskop.

2. Cytologische Untersuchungen

Für cytologische Untersuchungen benutzte ich Stanniussche Körperchen von Aalen, die 25 - 30 cm lang waren, und etwa 50 g wogen. Sie wurden ebenfalls durch Dekapitieren getötet, ihre Stanniusschen Körperchen nach Öffnen der Leibeshöhle vorsichtig aus dem Nierenparenchym herauspräpariert und bei 0 - 4° C fixiert. Vom Zeitpunkt des Tötens an bis zur Fixierung der Organe vergingen nie mehr als 3 Min. Andere, etwa 50 g schwere Aale erhielten 0.5 ml einer 1 %igen Pilokarpinlösung intraperitoneal injiziert. Nach 10 Std. wurden sie ebenfalls durch Dekapitieren getötet und ihre StK fixiert.

Als Standard-Fixierungsmittel benutzte ich 1 %ige gepufferte OsO_4 - Lösung (Palade 1952) und 0.6 %ige gepufferte $KMnO_4$ - Lösung (Luft 1956). Der p_H - Wert der Lösungen betrug etwa 7. In einigen Fällen fixierte ich mit 1 %iger OsO_4 - Lösung, die mit einem dem Aalblut (Δ = - 0.62° C, Schlieper 1930) isotonischen Phosphatpuffer (Lipp 1954) gepuffert worden war. Die Objekte, die anfänglich in dieser Weise fixiert wurden, unterschieden sich jedoch nicht von denen in veronal-acetat-haltigen Fixierungsmitteln fixierten. Aus diesem Grund benutzte ich später nur veronal-acetat-haltige Fixierungsmittel. In anderen Fällen wurde vor der Osmiumfixierung mit einer 8 %igen veronal-acetat-gepufferten Formollösung vorfixiert.

In Parallelversuchen fixierte ich StK pilokarpinbehandelter Tiere 30 Min. lang in 10 %iger gepufferter Formollösung und inkubierte sie anschliessend in einer 0.2 %igen Ribonukleaselösung (Karl Roth, Karlsruhe) bei 37° C. Nach 5 Min., 10 Min., 15 Min., 30 Min. und 60 Min. wurden die Drüsen aus dem Medium herausgenommen und in einer 1 %igen OsO_4 -Lösung fixiert.

Nach dem Fixieren wurden die etwa 1 mm grossen Stanniusschen Körperchen unter dem Stereo-Mikroskop mit einer Iridektomieschere und Nadeln zerkleinert und von der bindegewebigen Hülle befreit. Ich entwässerte die Objekte in Äthanol oder

Aceton und bettete sie entweder in Methacrylat, Vestopal W oder Araldit (Fluka) ein. Tabelle 9 gibt genaue Auskunft über die Behandlung der Objekte von der Fixierung bis zur Einbettung.

Tabelle 9

Fixieren, Entwässern und Einbetten
von elektronenmikroskopischen Präparaten

I	II	III	IV	V
OsO_4 2 Std.	OsO_4 2 Std.	Formol 1 Std.	$KMnO_4$ 90 Min.	OsO_4 2 Std.
Puffer 90 Min.	Puffer 90 Min.	OsO_4 2 Std.	Alkohol 25% 30 Min.	Puffer 90 Min.
Alkohol 50% 30 Min.		Puffer 90 Min.		Aceton 30 % 20 Min.
Alkohol 70% 30 Min.	→	Aceton 30 % 20 Min.		Aceton 50 % 20 Min.
Alkohol 85% 30 Min.		Aceton 50 % 20 Min.	←	Aceton 70 % 20 Min.
Alkohol 90% 1 Std.		Aceton 70 % 20 Min.		Aceton 90 % 1 Std.
Akohol abs. 2 Std.		Aceton 90 % 1 Std.		Aceton abs. 2 Std.
Methacrylat 14 : 6 + Benzoylperox. unvorpolym. 3 Std.		Aceton abs. 2 Std.		Acet./Araldit 3:1 30 Min.
		Aceton/Vestopal 3:1 1 Std.		Acet./Araldit 2:1 1 Std.
Methacrylat 14:6 + Benzoylperox. vorpolymeris. 24 Std.		Aceton/Vestopal 2:1 1 Std.		Acet./Araldit 1:1 1 Std.
		Aceton/Vestopal 1:1 1 Std.		Acet./Araldit 1:2 2 Std.
danach Auspolym. bei 65° C		Aceton/Vestopal 1:2 2 Std.		Araldit 24 Std.
		Vestopal 24 Std.		danach Auspolym. bei 60° C
		Vestopal + Initiator und Aktivator 5 Std.		
		danach Auspolym. bei 60° C		

Von den Blöcken wurden jeweils 1 - 2 µ dicke Schnitte mit einem Porter-Blum-Mikrotom angefertigt und ungefärbt mit einem Phasenkontrast-Mikroskop (Zeiss Standard WL) untersucht. Fand ich in einem Präparat einen besonders gut angeschnittenen Drüsenstrang, so spitzte ich unter einer Lupe den Block auf diesen zu. Mit einem Leitz-Ultra-Mikrotom oder LKB-Mikrotom wurden dann von dem Block ultradünne Schnitte (300 - 600 A) hergestellt, die ich mit Chloroformdämpfen streckte und auf Kupfernetzen auffing. Die Schnitte kontrastierte ich entweder mit einer gesättigten Uranylacetat-Lösung oder einer Bleihydroxid-Lösung (Millonig 1961). Mikroskopiert wurde mit einem Elmiskop I oder I b (Siemens) bei 60 000 V. Messungen führte ich, soweit nicht anders vermerkt, an osmiumfixiertem Material durch. Durchschnittswerte berechnete ich aus 30 - 50 Messungen.

Als Kontrollorgane wurden Teile eines Pankreas von der Maus in 1 %iger OsO_4 - Lösung, gepuffert nach Palade (1952), fixiert und in gleicher Weise wie die StK weiterverarbeitet.

3. Chemische Untersuchungen

Für chemische Untersuchungen benutzte ich Stanniussche Körperchen von 200 - 300 g schweren Aalen aus dem Steinhuder Meer. Diese wurden durch Dekapitieren getötet, die StK sowie zur Kontrolle Teile der Leber und Niere schnell herauspräpariert, sofort eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung (spätestens nach 12 Std.) bei - 5° C aufbewahrt. Die Untersuchungen führte ich in 4 Serien durch.

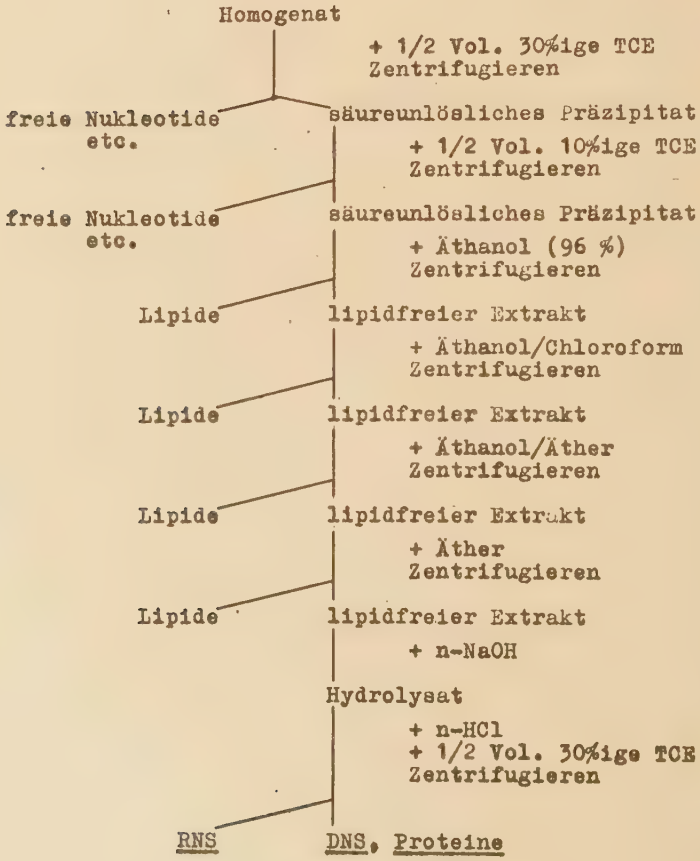
DNS-P und RNS-P wurden nach einer modifizierten Schmidt - Thannhauser-Methode isoliert (Schmidt und Thannhauser 1945, Antoni, Hidvégi und Lónai 1962). Dazu homogenisierte ich die Organe in eisgekühltem dest. Wasser, setzte anschliessend dem Homogenat das halbe Volumen in 30 %iger Trichloressigsäure-Lösung (TCE) zu und zentrifugierte in der Kälte das Präzipitat ab. Der Überstand, der unter anderem die freien Nukleotide enthielt, wurde verworfen, das säureunlösliche Präzipitat zweimal mit kalter 10 %iger TCE gewaschen. An-

schliessend extrahierte ich die Lipide durch Behandlung mit Äthanol (96 %), Äthanol/Chloroform (3 : 1), Äthanol/Äther (3 : 1) und Äther bei Zimmertemperatur. Die lipidfreie Fraktion, die im wesentlichen nur noch Proteine, DNS und RNS enthielt, wurde bei 37° C getrocknet und danach mit 1 ml einer n-NaOH bei 37° C für 18 Std. inkubiert. Nach der Hydrolyse neutralisierte ich mit 1 ml ein n-HCl und fällte mit dem halben Volumen in 30 %iger TCE DNS und Proteine aus. Die RNS befand sich im Überstand. Tabelle 10 gibt genaue Auskunft über den Auftrennungsgang. Die quantitative Bestimmung der Nukleinsäuren führte ich mit Hilfe von Farbreaktionen nach Ceriotti (1955) durch. Zur Bestimmung von DNS-P wurden 2 ml des hydrolisierten und anschliessend neutralisierten TCE-Extraktes mit 1 ml Indol-Reagens (0.04 %ige wässerige Indol-Lösung) und 1 ml konz. HCl versetzt und für 10 Min. in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach schnellem Abkühlen extrahierte ich mit Chloroform den roten Farbton, der sich beim Erhitzen gebildet hatte. Die wässerige Phase behielt eine gelbe Farbe, die von der DNS herrührte. Mit einem Zeiss-Spektrophotometer wurde bei 490 nm die Extinktion gegen den Leerwert gemessen. Zur Bestimmung von RNS-P versetzte ich 2 ml des Überstandes + 1 ml dest. Wasser mit 3 ml Orcinol-Reagens (60 mg crist. Orcin pro 10 ml einer 0.02 %igen $FeCl_3$. 6 H_2O - Lösung in konz. HCl) und stellte die Mischung für 30 Min. in ein kochendes Wasserbad. Nach schnellem Abkühlen wurde die Extinktion bei 665 nm gegen den Leerwert gemessen.

Vor dem oben beschriebenen Homogenisieren trocknete ich die Organe mit Filterpapier leicht ab und bestimmte ihr Frischgewicht. Um das Trockengewicht zu ermitteln, wurden die StK der ersten Serie nach dem Homogenisieren und anschliessendem Fällen mit 30 %iger TCE bei 100° C im Thermostaten getrocknet. Es bildete sich kein pulveriger Rückstand, sondern eine braune, ölig-schmierige Masse, die sich nur schlecht in andere Gefässe überführen liess. Die braune Farbe war nur teilweise mit Alkohol, Chloroform und Äther herauszulösen. Um eine mögliche Oxidation weitgehend zu verhindern und

Tabelle 10

Auftrennungsgang
(modifizierte Methode von Schmidt und Thannhauser)



besser die Substanzen in andere Gefässe überführen zu können, trocknete ich die Organe der 2. - 4. Serie nach der Frischgewichtsbestimmung 24 Std. lang durch Gefriertrocknung in einem Kryostaten (Phywe - Leybold). Anschliessend wurde das Gewicht bestimmt, die Organe homogenisiert und wie oben beschrieben weiter verarbeitet. Der Lipidextraktion schloss sich erneut eine Gewichtsbestimmung an. Die in Alkohl, Chloroform und Äther lösliche Fraktion wurde in ein gemeinsames Gefäss überführt und anhand von Tüpfelproben qualitativ untersucht. Dazu wurden nach alkalischer Hydrolyse und anschliessender Neutralisation Proben auf Lipide mit Bromthymolblau (Jatzkewitz und Mehl 1960), primäre Amine mit Ninhydrin-Reagens (Cramer 1958), quartäre Amine mit der Dragendorff-Färbung (Wagner, Hörhammer und Wolff 1961), Steroide mit Toluolsulfonsäure (Epstein, Maddock und Boyle 1957) und Phosphat (Hanes und Isherwood 1949) geprüft.

4. Autoradiographische Untersuchungen

Versuche mit H^3 - Leucin

6 etwa 50 g schwere Flussaale erhielten intraperitoneal je 10 mC H^3 - Leucin (= 0.2 mC pro g Körpergewicht) injiziert. Das Präparat hatte eine spezifische Aktivität von 1000 mC/mMol.. 45 Min., 90 Min., 2 Std., 4 Std., 7 Std. und 12 Std. nach der Injektion wurden die Tiere dekapitiert und eines ihres Stanniusschen Körperchen in 1 %iger gepufferter OsO_4 - Lösung (Palade 1952), das andere in neutralem 6 %igem Formol fixiert. Zur Kontrolle fixierte ich Teile ihrer Leber und Niere in 6 %igem Formol. Um adsorbiertes, d. h. nicht eingebautes H^3 - Leucin aus dem Gewebe herauszulösen, setzte ich der Formollösung 0.1 mg/ml inaktives Leucin zu. Das osmiumfixierte Gewebe dagegen wurde erst in der Waschlösung mit inaktivem Leucin behandelt. Nach 12stündigem Fixieren wurden die formolfixierten Objekte 24 Std lang in Pufferlösung gewaschen, danach in Isopropanol entwässert und in Paraffin eingebettet.In gleicher Weise wurden die osmiumfixierten Objekte behandelt. Nach dem Schneiden

und Entparaffinieren stellte ich von 3 µ dicken Schnitten Autoradiogramme her. Dazu wurden die Schnitte in unverdünnte, geschmolzene K 2 - Photoemulsion getaucht. Nach Expositionszeiten von 2 - 20 Tagen wurden die Autoradiogramme in einem amidolhaltigen Entwickler (Amidol Merck) 3 Min. lang bei 12° C entwickelt und mit einem sauren Photofixier fixiert. Sowohl die formol- als auch die osmiumfixierten Präparate wurden durch die Filmschichten durch mit Hämatoxylin gefärbt und mit dem Lichtmikroskop untersucht.

Da die Zellen der StK am besten nach Fixierung mit Osmiumtetroxid erhalten bleiben, zog ich osmiumfixiertes Gewebe zu qualitativen und quantitativen Auswertungen heran, benutzte aber für quantitative Auswertungen auch formolfixiertes Material. Ich hatte zuvor an osmiumfixiertem,inaktivem Material festgestellt, dass Osmium keine mit der angewandten Technik nachweisbare Eigenstrahlung hat. Der Nulleffekt der Präparate erwies sich als sehr gering und konnte deshalb beim Auswerten vernachlässigt werden.

In einem Fall (das Tier wurde 2 Std. nach der Injektion getötet) bettete ich das in OsO_4 - Lösung fixierte StK nicht in Paraffin, sondern in Araldit ein. Goldgelbe Schnitte (etwa 1000 A dick), die mit einem Leitz-Ultramikrotom hergestellt und auf Metallnetzen aufgefangen wurden, bedeckte ich mit einem dünnen Film einer L 4-Photoemulsion. Ich hielt mich dabei an das von Revel und Hay (1961) entwickelte Verfahren. Die Präparate wurden 18 Tage lang exponiert und 1/2 Min., 1 Min., 1 1/2 Min. oder 2 Min. lang mit einem amidolhaltigen Entwickler bei 12° C entwickelt und sauer fixiert. Die Filmschicht wurde bei einigen Präparaten durch Kontrastieren mit einer Bleihydroxid-Lösung entfernt. Ich habe durch Mikroskopieren vor und nach der Kontrastierung festgestellt, dass beim Lösen der Filmschicht die Silberkörner nicht verlagert werden.

Ausgewertet habe ich in der Weise, dass ich die Silberkörner über den verschiedenen Regionen in der Zelle auszählte. Um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass es sich bei gezählten Silberkörnern um Nulleffekt handelt, kontrollierte

ich stets Nachbarschnitte, ob an gleicher oder benachbarter Stelle ebenfalls Silberkörner liegen. Die Präparate wurden mit einem Elmiskop I b (Siemens) bei 60 000 V mikroskopiert.

Zwei weiteren Aalen (90 g und 66 g schwer) injizierte ich 0.5 ml einer 1 %igen Pilokarpinlösung intraperitoneal. 10 Std. danach erhielt der erste 18 mC H^3 - Leucin (= 0.2 mC pro g Körpergewicht) ebenfalls i. p.. Die spezifische Aktivität der Präparate betrug 1 000 mC/mMol. 90 Min. nach der Injektion wurden die Aale dekapitiert und von Stanniusschen Körperchen, Leber und Niere in beschriebener Weise Autoradiogramme hergestellt. Für quantitative Auswertungen wurden nur Autoradiogramme des Aales herangezogen, der 0.2 mC H^3 - Leucin pro g Körpergewicht erhalten hatte.

Versuche mit H^3 - Cytidin

Zwei etwa 50 g schwere Aale erhielten je 5 mC H^3 - Cytidin (= 0.1 mC pro g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Das Präparat hatte eine spezifische Aktivität von etwa 1 500 mC/mMol. Eines der Tiere wurde 10 Std. vor der Cytidin-Injektion mit 0.5 ml einer 1 %igen Pilokarpinlösung belastet. Beide Aale tötete ich 90 Min. nach der H^3 - Cytidin-Injektion und fixierte ihre Stanniusschen Körperchen in OsO_4 - Lösung und Formol sowie Teile der Leber und Niere in Formol. Die Weiterverarbeitung der Organe geschah wie bereits beschrieben.

In-vitro-Versuche mit H^3 - Leucin

Um die Wirkungsweise des Pilokarpins weiter studieren zu können, führte ich folgenden Versuch durch: 4 Stanniussche Körperchen wurden in einer Aalringer-Lösung (Schlieper 1933), die pro ml 0.2 mC H^3 - Leucin enthielt, inkubiert. 15 Min., 30 Min., 60 Min. und 90 Min. danach wurden die StK aus dem Medium herausgenommen und in 1 %iger OsO_4 - Lösung fixiert. 4 weitere StK wurden in ein gleiches Inkubationsmedium gelegt, jedoch enthielt dieses zusätzlich 40 γ/ml Pilokarpin.

Auch hier wurden die Drüsen nach 15 Min., 30 Min., 60 Min. und 90 Min. in 1 %iger OsO_4 - Lösung fixiert. Die Weiterverarbeitung geschah in beschriebener Weise.

5. Histochemischer Phosphatidnachweis

Die Untersuchungen führte ich an Stanniusschen Körperchen von etwa 30 cm langen Aalen aus dem Steinhuder Meer durch. Nach dem Fixieren in Calcium-Formol stellte ich von den StK etwa 10 µ dicke Schnitte mit einem Kryostaten (System Dittes - Duspiva) her. Zum Nachweis von Phosphatiden führte ich den sauren Haematein-Test nach Baker (1946) durch, und zwar in der Weise, wie ihn Lipp (1960) angibt. Zur Kontrolle wurden Teile der Niere in gleicher Weise behandelt. In zwei Fällen erhielten die Aale 10 Std. vor der Tötung 0.5 ml einer 1 %igen Pilokarpin-Lösung intraperitoneal injiziert. An ihren StK wurde der Baker-Test durchgeführt. In Kontrollversuchen zum Phosphatidnachweis extrahierte ich aus Stanniusschen Körperchen ungereizter Tiere mit Pyridin sämtliche Fette (Baker 1946) nach den Vorschriften von Lipp (1960).

Zum histochemischen Nachweis von Steroiden in den Zellen der StK wurde die Schultz-Reaktion nach Okamoto (1944) durchgeführt. Dabei hielt ich mich ebenfalls an die von Lipp angegebenen Vorschriften.

G. Literaturverzeichnis

1. Aboim, A. N. (1946): L'organe interrénal des cyclostomes et des poissons. Portugaliae Acta Biol. 1, 353 - 383.
2. Afzelius, B. A.: Chemical Fixatives for Electron Microscopy. In: The Interpretation of Ultrastructure. Ed. R. J. C. Harris. New York 1962, 1 - 19.
3. Afzelius, B. A. u. G. Fridberg (1963): The Fine Structure of the Caudal Neurosecretory System in Raja batis. Z. Zellforsch. 59, 289 - 308.
4. Antoni, F., E. J. Hidvégi u. P. Lónai (1962): Isolation of Cell Nuclei from Lettré-Ehrlich Ascites Tumour cells in Glycerol Medium. Acta Physiologica Academia Scientiarum Hungaricae 21, 325 - 334.
5. Bachmann, R.: Die Nebenniere. In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Herausg. W. Bargmann. 6. Bd., 5. Teil, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954, 1 - 952.
6. Baker, J. R. (1946): The Histochemical Recognition of Lipine. Quart. J. Micr. Sci. 87, 441 - 470.
7. Bauchot, R. (1953): Anatomie comparée des Corpuscules de Stannius chez les Téléostéens. Arch. Zool. Exp. Génér. 89, 147 - 168.
8. Bobin, G. (1949): Images histo-cytologiques des Corpuscules de Stannius de l'anguille européenne. Arch. Zool. 86, 1 - 7.
9. Brachet, J. (1942): La Localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'Amphibiens en voie de développement. Arch. biol. (Liège) 53, 207 - 257.
10. Caspersson, T. (1941): Studien über den Eiweissumsatz der Zelle. Naturwiss. 29, 33 - 43.
11. Ceriotti, G. (1955): Determination of Nucleic Acids in Animal tissues. J. Biol. Chem. 214, 59 - 70.

12. Chavin, W. (1954): The role of pituitary-adrenal mechanism in the reappearance of melanin and melanophores in the goldfish, Carassius auratus. Doctorate thesis. Zit. nach: Rasquin, P. (1956): Cytological Evidence for a role of the Corpusles of Stannius in the Osmoregulation of Teleosts. Biol. Bull. 111, 399 - 409.

13. Christensen, K. A. u. Don W. Fawcett (1961): The Normal Fine Structure of Opossum Testicular Interstitial Cells. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 653 - 670.

14. Cramer, F.: Papierchromatographie. 4. Aufl., Verl. Chemie 1958, 93.

15. Davidson, J. N.: The Biochemistry of Nucleic Acids. London 1960.

16. Diamare, V. (1933): L'organo interenale, i corpuscoli di Stannius del mesonefro, i cordoni epitheliali ed il tessuto cromaffine del rene cefalico dei Teleostei. Atti R. Acc. Sc. Fis. Mat. (Napoli) 19, série 2, 1 - 67.

17. Ecker, A.: Der feinere Bau der Nebennieren beim Menschen und den vier Tierklassen. Braunschweig 1846.

18. Ekholm, R., Y. Edlund u. T. Zelander (1962): The Ultrastructure of the Rat Exocrine Pancreas after Brief Ethionine Exposure. J. Ultrastructure Research 7, 102 - 120.

19. Epstein, E., W. O. Maddock u. A. J. Boyle (1957): p-Toluenesulfonic Acid Spot Plate Test for Steroids. Analytic. Chem. 29, 1548 - 1549.

20. Ficq, A. u. J. Brachet (1956): Distribution de l'acide ribonucléique et incorporation de la Phenylalanine - C^{14} dans les protéines. Exp. Cell Res. 11, 135-145.

21. Fontaine, M. u. J. Hatey (1955): Variations liées au sexe et à la maturité génitale de la teneur en acide ascorbique des Corpuscules de Stannius du saumon adulte (Salmo salar L.) J. Physiol. 47, 725 - 730.

22. Fontaine, M. u. J. Leloup-Hatey (1959): Mise en evidence de corticostéroides dans l'interrénale d'un Téléostéen: le saumon (Salmo salar L.). J. Physiol. 51, 468 - 469.

23. Ford, P. : Some observations on the Corpuscles of Stannius. In: Comparative Endocrinology. Ed. A. Gorbman. New York 1959, 728 - 734.

24. Gabe, M. u. L. Arvy: Gland Cells. In: The Cell. Ed. J. Brachet u. A. Mirsky. Bd. 5, New York 1961, 1 - 88.

25. Garret, F. D. (1942): The development and phylogeny of the Corpuscle of Stannius in ganoid and teleostean fishes. J. Morph. 70, 41 - 68.

26. Giacomini, E. (1911): Rend. R.Accad. d. Inst. Bologna 15. Zit. nach: H. Berkelbach van der Sprenkel: Nebenniere und Paraganglien. In: Handbuch der vergl. Anatomie der Wirbeltiere. Herausg. L. Bolk et al. Berlin 1934, Bd. 2, 1. Hälfte, 777 - 816.

27. Giacomini, E. (1922). A. ital. Anat. e Embr. 18(Suppl.). Zitat nach: H. Berkelbach van der Sprenkel: Nebenniere und Paraganglien. In: Handbuch der vergl. Anatomie der Wirbeltiere.Herausg. L. Bolk et al. Berlin 1934, Bd. 2, 1. Hälfte, 777 - 816.

28. Gierer, A. (1963): Function of aggregated Reticulocyte Ribosomes in Protein Synthesis. J. Mol. Biol. 6, 148 - 157.

29. Grosglik, S. (1885): Zur Morphologie der Kopfniere der Fische. Zool. Anz. 8, 605 - 611.

30. Hanes, C. S. u. F. A. Isherwood (1949): Nature 164, 1107.

31. Hirsch, G. C.: Das Lamellen-Vakuolen-Feld. In: Handbuch der Biologie, Bd. 1, Dynamik der tierischen Zelle. Kap. VII, 1962, 409 - 452.

32. Huxley, H. E. u. G. Zubay (1960): Electron Microscope Observations on the Structure of Microsomal Particles from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 2, 10 - 18.

33. Jatzkewitz, H. u. E. Mehl (1960): Zur Dünnschicht-Chromatographie der Gehirn-Lipoide, ihrer Um- und Abbauprodukte. Z. physiol. Chemie 320, 251 - 257.

34. Krauter, D. (1958): Experimentelle Untersuchungen über das Interrenalorgan von Knochenfischen. Roux' Arch. Entwicklungsmech. 150, 607 - 637.

35. Kurosumi, K. (1957): Denshi Kembikyo (Tokio) 6, 101.Z.it. nach Kurosumi,K. (1961): Electron Microscopic Analysis of the Secretion Mechanism.Int.Rev.Cytol.11, 1 - 124.

36. Kurosumi, K. (1961): Electron Microscopic Analysis of the Secretion Mechanism. Int.Rev.Cytol. 11, 1 - 124.

37. Kurosumi, K., M. Yamagishi u. T. Nagakawa (1958): Okajimas Folia Anat. Japon. 30, 369. Zit. nach: Kurosumi, K. (1961): Electron Microscopic Analysis of the Secretion Mechanism. Int.Rev.Cytol. 11, 1 - 124.

38. Lipp, W.: Histochemische Methoden, Lieferung 1 - 19. München 1954 - 1962.

39. Luft, J. H. (1956): Permanganate - a new fixative for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 799 - 802.

40. Maurer, W.: Über die Grösse des Umsatzes von Organ- und Plasmaeiweiss. 10. Coll. d. Ges. f. Physiol. Chemie, Mosbach 1959. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959. 1 - 49.

41. Millonig, G. (1961): A modified procedure for lead staining of thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 736 - 739.

42. Niklas, A. u. W. Oehlert (1956): Autoradiographische Untersuchungen der Grösse des Eiweissstoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. Beitr. pathol. Anat. 116, 92 - 123.

43. Oehlert, W. (1961): Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure-Synthese in den verschiedenen Strukturen der Zelle. Beitr. pathol. Anat. 124, 311 - 350.

44. Okamoto, K. u. H. Shimamoto u. H. Sonoda (1944): Jap. J. Const. Med. 13, 113. Zit. nach W. Lipp: Histochemische Methoden, Lieferung 1 - 19. München 1954 - 1962.

45. Olivereau, M. (1961): Corpuscules de Stannius et reproduction chez l'Anguille mâle. C.R.Acad.Sc. (Paris) 253, 541 - 543.

46. Palade, G. E. (1952): A study of fixation for electron microscopy. J.Exp.Med. 95, 285 - 297.

47. Palade, G. E. (1956): Intracisternal Granules in the exocrine Cells of the Pancreas. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 417 - 422.

48. Pettit, A. (1896): Sur le mode de fonctionnement de la glande surrénale. C. R. Soc.Biol. (Paris) 48, 320 - 322.

49. Phillips, J. G. u. P. J. Mulrow (1959): Failure of Corpuscle of Stannius from winter-flounder (Pseudopleuronectes americanus)to synthesize adrenocorticosteroids in vitro. Nature 184, 558.

50. Pickford, G. E. (1953): A Study of the hypophysectomized male killifish Fundulus heteroclitus L. Bull. Bingham Oceanogr.-Coll. 14, 5 - 41.

51. Porter, K. R.: The Ground Stubstance, Observations from Electron Micorscopy. In: The Cell. Ed. J. Brachet u. A. E. Mirsky. Bd. 2 N.Y. 1961, 621 - 675.

52. Rasquin, P. (1951): Effects of carp pituitary and mammalian ACTH on the endocrine and lymphoid systems of the Teleost Astyanax mexicanus. J.Exp. Zool. 117, 317 - 355.

53. Rasquin, P.(1956): Cytological Evidence for a role of the Corpuscles of Stannius in the Osmoregulation of Teleosts. Biol. Bull. 111, 399 - 409.

54. Revel, J. P. u. E. D. Hay (1961): Autoradiographic Localization of DNA Synthesis in a specific ultrastructural component of the Interphase Nucleus. Exp. Cell Res. 25, 474 - 480.

55. Ristow, H. u. H. Piepho (1963): Über die Bildung der Sekretgranula in den Stanniusschen Körperchen des Flussaales. Naturwiss. 50, 382 - 383.

56. Ristow, H. u. H. Piepho, unveröffentlicht.

57. Rosenbluth, J. (1963): Contrast between osmium-fixed and permanganat-fixed Toad Spinal Ganglia. J. Cell Biol. 16, 143 - 158.

58. Scharrer, E. u. S. Brown (1961): Neurosecretion XII: The formation of neurosecretory Granules in the Earthworm Lumbricus terrestris L. Z. Zellforsch. 54, 530 - 540.

59. Schlieper, C. (1930): Die Osmoregulation wasserlebender Tiere. Biol. Rev. 5, 309 - 356.

60. Schlieper, C. (1933): Über die Permeabilität der Aalkiemen. Z. vergl. Physiol. 19, 68 - 83.

61. Schmidt, G. u. S. J. Thannhauser (1945): A method for the determination of Desoxyribonucleic acid, Ribonucleic acid, and Phosphor proteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, 83 - 89.

62. Schultze, B., W. Oehlert u. W. Maurer (1960): Vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit H^3-, C^{14}- und S^{35} - markierten Aminosäuren zur Grösse des Eiweissstoffwechsels einzelner Gewebe und Zellarten bei Maus, Ratte und Kaninchen. Beitr. pathol. Anat. 122, 405 - 431.

63. Schultze, B., W. Oehlert und W. Maurer (1961): Über eine allgemeine Beziehung zwischen der Umsatzrate der Ribonukleinsäure und des Eiweisses im Organismus von Maus und Ratte. Biochim. Biophys. Acta 49, 35 - 46.

64. Sedar, A. W. (1961): Electron microscopy of the Oxyntic Cell in the Gastric Glands of the Bullfrog (Rana catesbiana). II. The Acid Secreting Gastric Mucosa. J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 47 - 57.

65. Siekevitz, P. u. G. E. Palade (1958): A Cytochemical Study on the Pancreas of the Guinea Pig. III. In vivo Incorporation of Leucine -1-C^{14} into the Proteins of Cell Fractions. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 557 - 566.

66. Siekevitz, P. u. G. E. Palade (1959): A Cytochemical Study on the Pancreas of the Guinea Pig. IV. Chemical and Metabolic Investigation of the Ribonucleoprotein Particles. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 1 - 10.

67. Siekevitz, P. u. G. E. Palade (1960a): A Cytochemical Study on the Pancreas of the Guinea Pig. V. In vivo Incorporation of Leucine -1-C^{14} into Chymotrypsinogen of various Cell Fractions. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 619 - 630.

68. Siekevitz, P. u. G. E. Palade (1960b): A Cytochemical Study on the Pancreas of the Guinea Pig. VI. Release of Enzymes and Ribonucleic Acid from Ribonucleoprotein Particles. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 631 - 644.

69. Siekevitz, P. u. G. E. Palade (1962): Cytochemical Study on the Exocrine Pancreas of the Guinea Pig. VII. Effects of Spermine on Ribosomes. J. Cell Biol. 13, 217 - 232.

70. Stannius, H. (1839): Über Nebennieren bei Knochenfischen. Müllers Arch. Anat. Physiol. u. wissenschaftl. Medizin, 97 - 101.

71. Stöcker, E. (1962): Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure- und Eiweissynthese im nuklearen Funktionsformwechsel der exokrinen Pankreaszelle. Z. Zellforsch. 57, 145 - 171.

72. Tissières, A., J. D. Watson, D. Schlesinger u. B. R. Hollingworth (1959): Ribonucleoprotein Particles from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 1, 221 - 233.

73. Vincent, S. (1897): On the Morphology and Physiology of the Suprarenal Capsules in Fishes. Anat. Anz. 13, 39 - 48.

74. Vincent, S. (1898): The Effects of Extirpation of Suprarenal Bodies of the Eel (Anguilla anguilla). Proc. Roy. Soc. London 62, 354 - 356.

75. Wagner, H., L. Hörhammer u. P. Wolff (1961): Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. Biochem. Z. 334, 175 - 184.

76. Weissenfels, N. (1957): Über die funktionelle Entleerung, den Feinbau und die Entwicklung von Tumor-Mitochondrien. Z. Naturforsch. 12 b, 168 - 171.

77. Weissenfels, N. (1958): Über die Entleerung und Entwicklung der Mitochondrien und den Feinbau des Cytoplasmas von embryonalen Zellen. Z. Naturforsch. 13 b, 182 - 186.

78. Wissig, L. S. (1963): The Anatomy of Secretion in the Follicular Cells of the Thyroid Gland. II. The Effect of Acute Thyreotrophic Hormone Stimulation on the Secretory Apparatus. J. Cell Biol. 16, 93 - 117.

79. Wohlfahrt - Bottermann, K. E. (1956): Die Feinstruktur der Mitochondrien von Paramecium caudatum. Z. Naturforsch. 11 b, 578 - 581.

80. Wohlfahrt - Bottermann, K. E. (1957): Die Entstehung, Vermehrung und Sekretabgabe der Mitochondrien von Paramecium. Z. Naturforsch. 12 b, 164 - 167.

ANHANG

Abb. 1. StK ist von einer bindegewebigen Kapsel (K) umgeben und in Nierengewebe (N) eingebettet. Carnoy - Fixierung, Paraffin, H. E., Vergr. 380fach

Abb. 2. In Drüsensträngen (S), die von Blutkapillaren (B) umgeben werden, sind manchmal Lichtungen (L) zu beobachten. Ausschnitt aus Abb. 1, Vergr. 500fach

Abb. 3. In den Lichtungen (L) der Drüsenstränge (S) dieses StK liegen vereinzelt Zellkerne (Pfeil), die sich in Form und Anfärbbarkeit nicht von anderen unterscheiden. Carnoy - Fixierung, Paraffin, Azan, Vergr. 500fach

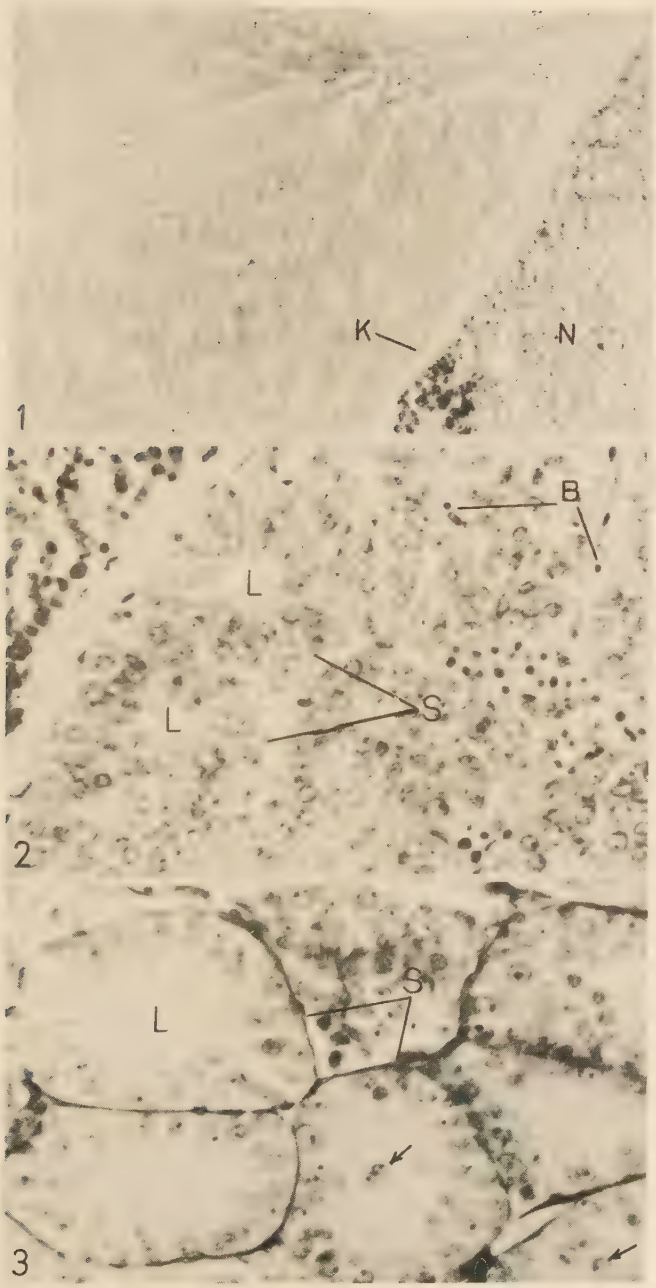
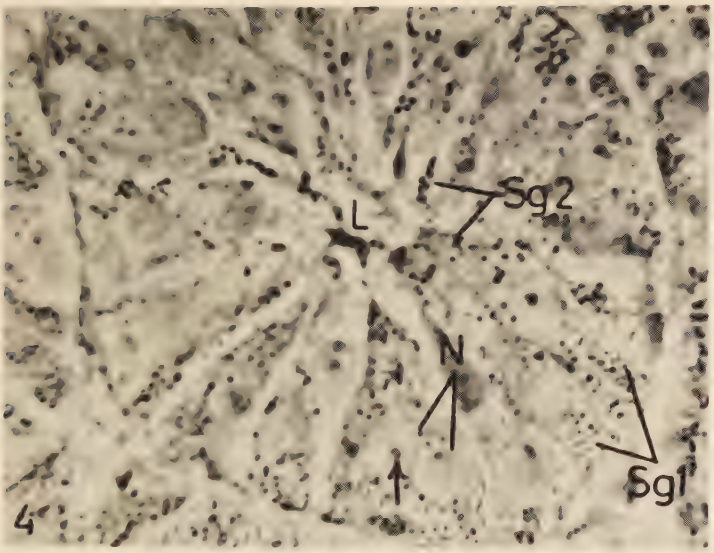

K
N
1
B
L
L
S
2
L
S
3

Abb. 4. Der Drüsenstrang eines StK, fixiert in ungepuf=fer=ter OsO_4-Lösung, zeigt eine Lichtung (L). Die Zellen enthalten in ihrem Mittelteil einen Zellkern (N) mit einem meist stark osmiophilen Nukleolus (Pfeil). Die mei=sten Sekretgranula liegen im äußeren (Sg1), einige jedoch auch im inneren Teil (Sg2) der Zelle. OsO_4, Par=af=fin, Phasenkontrast, Vergr. 800fach

Abb. 5. Im elektronenmikroskopischen Bild erweist sich die Lichtung (L) eines Drüsenstranges als Zerreißung. OsO_4, Methacrylat, Vergr. 20 000fach


L
Sg2
N
Sg1
4

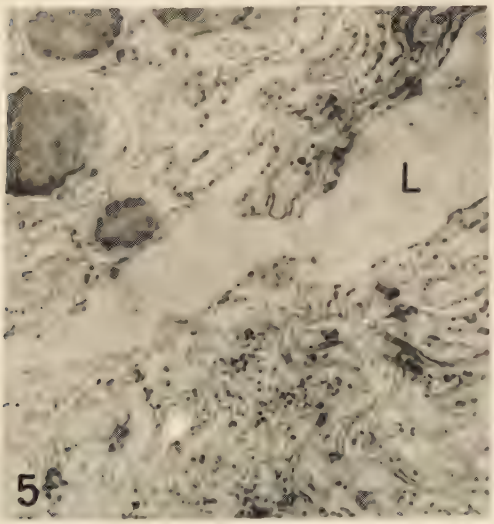

L
5

Abb. 6. Zellgrenzmembranen (ZM), Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ERM) und Mitochondrienmembranen (MM) bestehen aus zwei osmiophilen und einer osmiophoben Untereinheit. Ribosomen (R) haften an den ER - Membranen oder liegen frei im Cytoplasma. OsO_4, Methacrylat, Bleihydroxid, Vergr. 110 000fach

Abb. 7. Äußere (Ka) und innere (Ki) Kernmembranen werden oft an Stellen, an denen weniger dichtes Kernmaterial der inneren Kernmembran aufliegt, von einem Porenkanal (Pfeil) durchbrochen. Formol, OsO_4, Vestopal, Bleihydroxid Vergr. 45 000fach

Abb. 8. Zellgrenzmembranen (ZM) weichen manchmal blasenförmig auseinander und sind dann von zahlreichen Poren (Pfeil) durchbrochen. Der Zwischenraum zwischen zwei Zellgrenzmembranen enthält eine körnige Substanz (k). Auf dem Bild lassen sich ferner Membranen von Sekretgranula (Sg), ein Zellkern (N), Mitochondrien (M) und Ergastoplasmastränge (ER) erkennen. $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 30 000fach

Abb. 9. Die Kernmembranen sind von zahlreichen Porenkanälchen (P) durchbrochen. Von der äußeren (Ka) faltet sich endoplasmatisches Retikulum ab (Pfeil). Auf dem Bild sind ferner der elektronenmikroskopisch leere Zellkern (N), Sekretgranula (Sg), Mitochondrien (M), endoplasmatisches Retikulum (ER) und Zellgrenzmembranen (ZM) sichtbar. $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 20 000fach

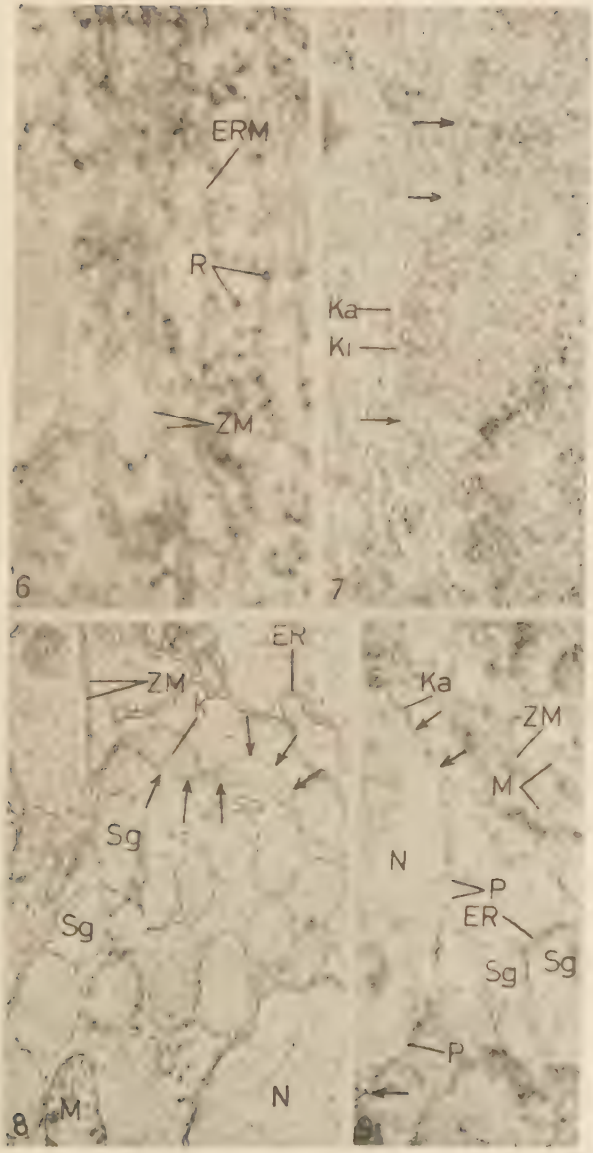

ERM
R
ZM
6
Ka
Ki
7
ZM
ER
Sg
Sg
M
N
8
Ka
ZM
M
N
P
ER
Sg
Sg
P

Abb. 10. Der Golgi - Apparat osmiumfixierter Zellen besteht aus etwa parallel verlaufenden Zisternen (Z), deren Enden manchmal aufgebläht und mit einer osmiophilen Substanz gefüllt sind (Pfeil). In unmittelbarer Nähe dazu liegen leere (Vl) oder mit osmiophiler Substanz gefüllte (Vs) Vakuolen sowie viele Vesikel (V). Ribosomen sind innerhalb des Golgi - Feldes, das stets in der Nähe des Kernes liegt, selten. Formol, OsO_4, Methacrylat, Uranylacetat, Vergr. 40 000fach

Abb. 11. In permanganatfixierten Zellen erscheint der Golgi - Apparat ebenfalls als parallel verlaufende Zisternen, die jedoch meist länger als die osmiumfixierter Zellen sind. An den Enden der Zisternen liegen zahlreiche Vesikel (V), die stets elektronenoptisch leer sind. Man kann zwischen weitlumigen (Zw) und englumigen (Ze) Golgi - Zisternen unterscheiden. Etwas abseits vom Golgi - Apparat liegen ein oder zwei englumige Zisternen (Za), die mit einer körnigen Substanz gefüllt sind. Auf dem Bild lassen sich ferner Membranen von Sekretgranula (Sg), Mitochondrien (M), Ergastoplasmazisternen (ER) und Zellgrenzmembranen (ZM) erkennen. $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 30 000fach

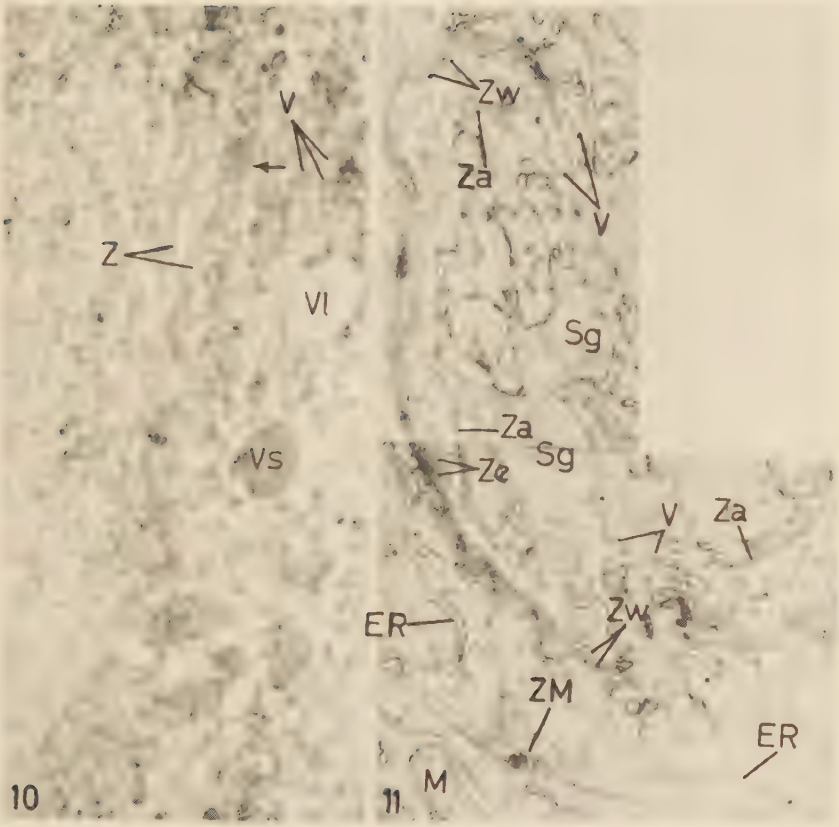
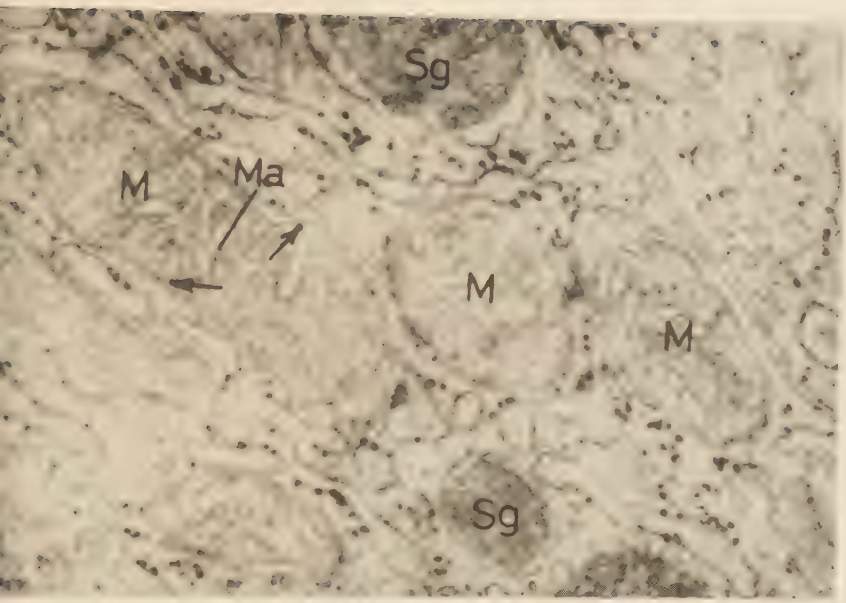

V
Z
Vl
Vs
10
Zw
Za
V
Sg
Za
Sg
Ze
V
Za
ER
Zw
ZM
ER
M
11

Abb. 12. Die Mitochondrien (M) der Stanniusschen Körperch enthalten eine im elektronenmikroskopischen Bild dunkel erscheinende Matrix (Ma) und werden von zwei Membranen umgeben. Die innere faltet sich ein (Pfeil) und bildet weitlumige Cristae. Die Sekretgranula (Sg) enthalten eine körnige osmiophile Substanz. OsO_4, Araldit, Bleihydroxid, Vergr. 60 000fach

Abb. 13. Ein Mitochondrium, das sich möglicherweise in Teilung befindet. OsO_4, Methacrylat, Bleihydroxid, Vergr. 90 000fach


Sg
M
Ma
M
M
Sg

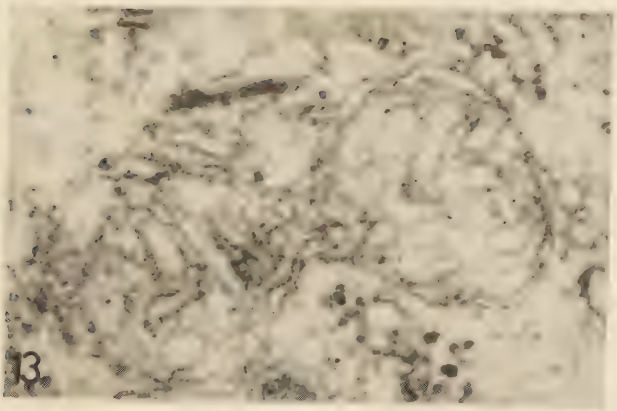

B.

Abb. 14 a - e. Amöbenartig aussehende Körper (M_1), die von einer Membran umgeben werden, enthalten eine körnige Grundsubstanz. Möglicherweise können sie sich teilen (Pfeil). Ähnliche Körper zeigen Einfaltungen oder den Cristae ähnliche Strukturen (M_2), andere haben ihre körnige Grundsubstanz verloren (M_3). Körper mit typischen Cristae (M_4) werden von einer zweiten Membran teilweise umgeben (Pfeil). Die Körper M_1 - M_4 liegen stets im mittleren Teil der Zelle in der Nähe des Golgi - Apparates (G) $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 20 000fach

Abb. 15 a - c. Mitochondrien, denen an einer Seite die äußere Membran fehlt und deren innere Membran zu einem sackförmigen Gebilde ausgewachsen ist (Pfeil), liegen immer im äußeren Teil der Zelle, oft in unmittelbarer Nähe von Sekretgranula (Sg). $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid Vergr. 20 000fach

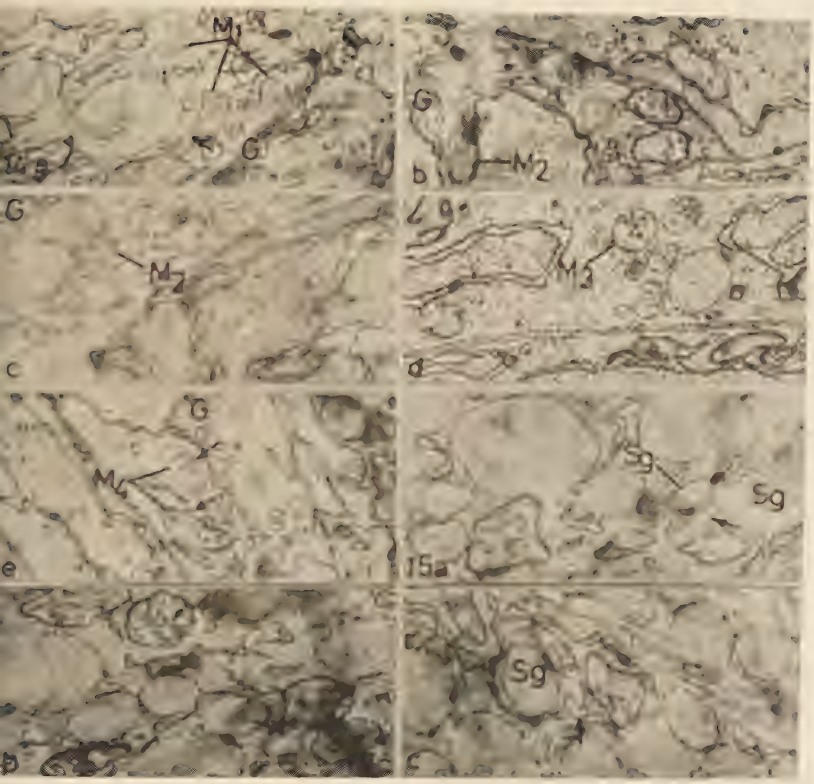

M1
G
a
G
b
M2
G
M2
c
M3
d
G
M4
e
Sg
Sg
15a
Sg
f

Abb. 16. Ein wie die StK fixiertes Mauspankreas enthält Zymogengranula (Z) mit einer dicht der osmiophilen Substanz anliegenden Membran. Die Mitochondrien (M) haben eng lumige Cristae. OsO_4, Araldit, Bleihydroxid, Vergr. 45 00

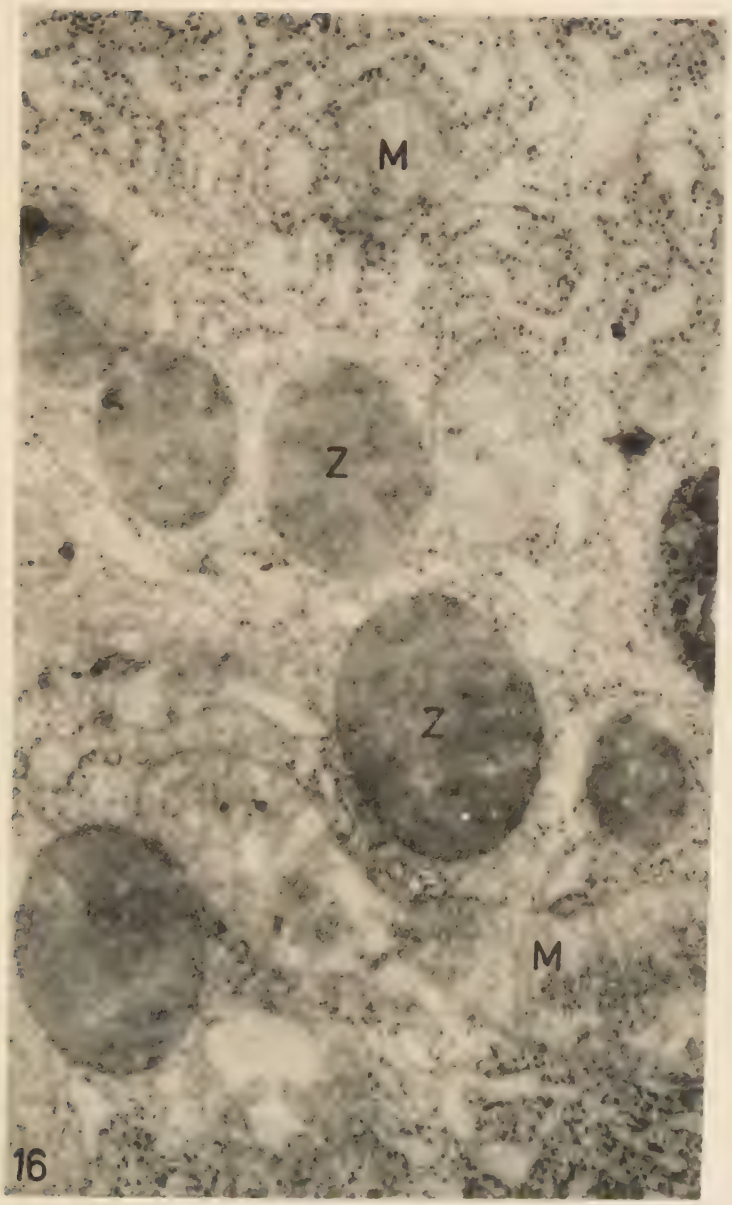
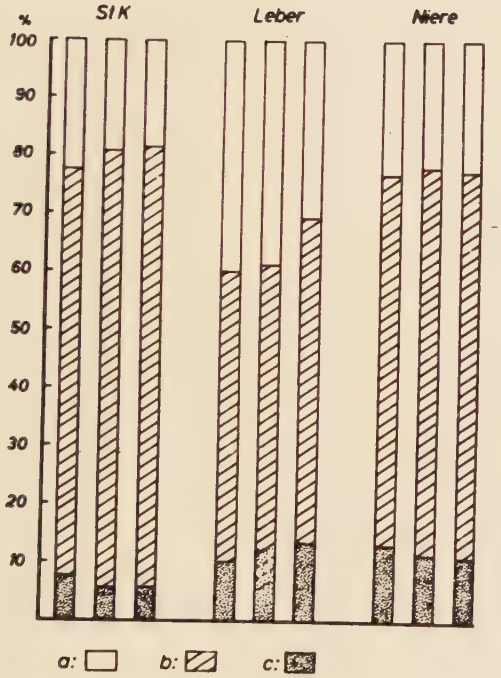

M
Z
Z
M
16

Abb. 17. Das Säulendiagramm veranschaulicht in Gewichtsprozenten einzelne Fraktionen, die aus Stanniusschen Körperchen, Aal - Leber und - Niere gewonnen wurden. Die Fraktion a besteht aus dem Wasser, das durch Gefriertrocknung den Geweben entzogen wurde. Die Fraktion b enthält hauptsächlich Lipide, die Fraktion c im wesentlichen Eiweiß. Eine Eiweißfraktion der Leber (2. Säule) ist verloren gegangen.



17

Abb. 18. Der Kappenschnitt durch einen Drüsenstrang eines ungereizten StK hat den äußeren, selten den mittleren Teil der Zellen getroffen. Zahlreiche, etwa gleichgroße Sekretgranula (Sg) lassen sich erkennen. Die in ihrem mittleren Teil angeschnittenen Zellen zeigen einen Zellkern (N) mit einem meist gut sichtbaren Nukleolus. OsO_4, Araldit, Phasenkontrast, Vergr. 1 300fach

Abb. 19. Zwei Drüsenstränge pilokarpingereizter StK werden von einer Blutkapillare (B) von einander getrennt. Ihre Zellen befinden sich in verschiedenen Stadien der Sekretbildung. So erkennt man Zellen mit Sekretgranula, die etwa so groß sind wie die ungereizter StK (Z3), andere mit kleineren (Z2), wiederum andere mit solchen, die kaum noch mit dem Lichtmikroskop aufgelöst werden (Z1). OsO_4, Araldit, Phasenkontrast, Vergr. 1 300fach

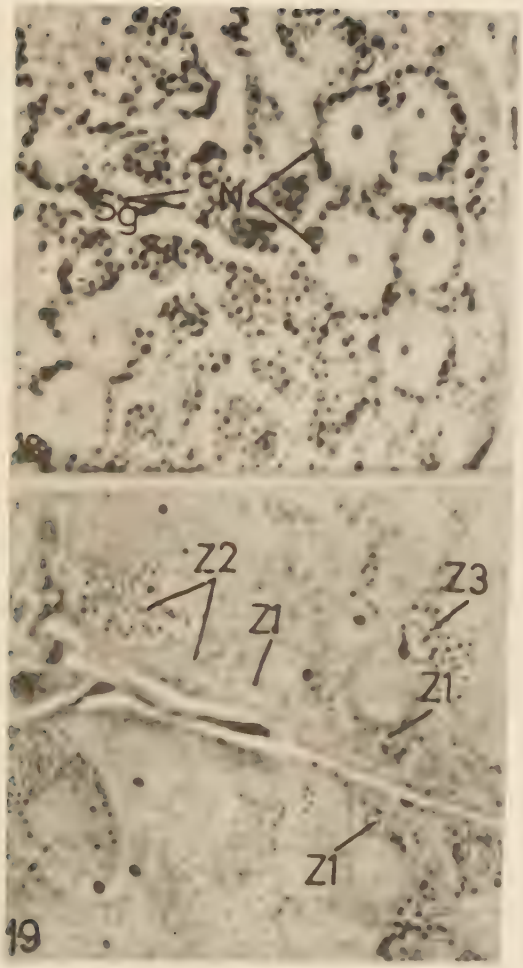

Sg
M
Z2
Z1
Z3
Z1
Z1
19

Abb. 20. In einem pilokarpingereizten StK befinden sich die Zellen in verschiedenen Stadien der Sekretbildung. Zelle I enthält neben einem Kern (N) mit einem Nukleolus (Nl) vorwiegend parallel zu ihrer Längsachse angeordnetes Ergastoplasma (ER). Zwischen den ER - Strängen lassen sich fast keine anderen Zellorganellen erkennen. Zelle II und III enthalten viele kleine Sekretgranula (Sg). Die kleinsten haben eine noch nicht allseitig umschließende Membran (Pfeil). Die Ergastoplasmastränge sind zerissen, ihre Anzahl hat sich deutlich vermindert. Man beobachtet jetzt im Außenteil eine Fülle von Mitochondrien.(M). In den Zellen IV und V sind die Sekretgranula größer als in II und III. Das ER hat sich weiter vermindert, ebenso die Anzahl der Mitochondrien. B bezeichnet eine den Drüsenstrang umgebende Blutkapillare. $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid, Verg. 15 000fach

V
I
IV
II
III

Abb. 21. Im rechten unteren Teil des Bildes liegen zwei Zellen, in denen keine Sekretgranula, jedoch ein gut entwickeltes Ergastoplasma (ER) und viele Mitochondrien (M) vorhanden sind. Man kann die ursprünglich parallele Anordnung der ER - Zisternen erkennen, die jedoch an den Stellen aufgelockert ist, an denen Mitochondrien liegen. Die anderen Zellen enthalten teilweise große Sekretgranula (Sg) und spärliches Ergastoplasma. In einem Kern ist ein wabiger Nukleolus sichtbar. $KMnO_4$, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 15 000fach

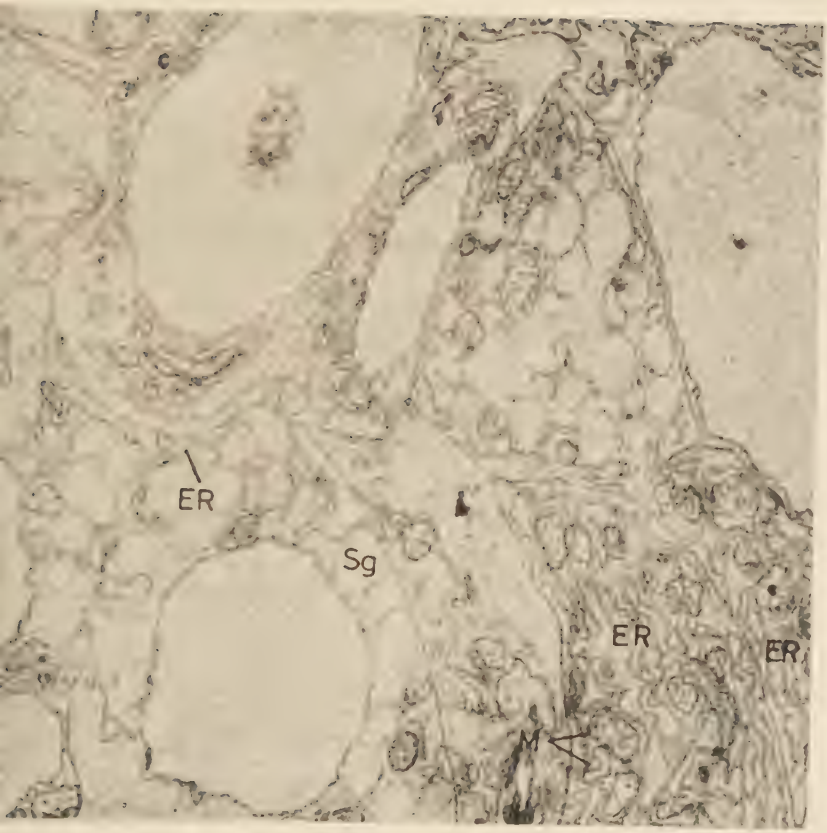
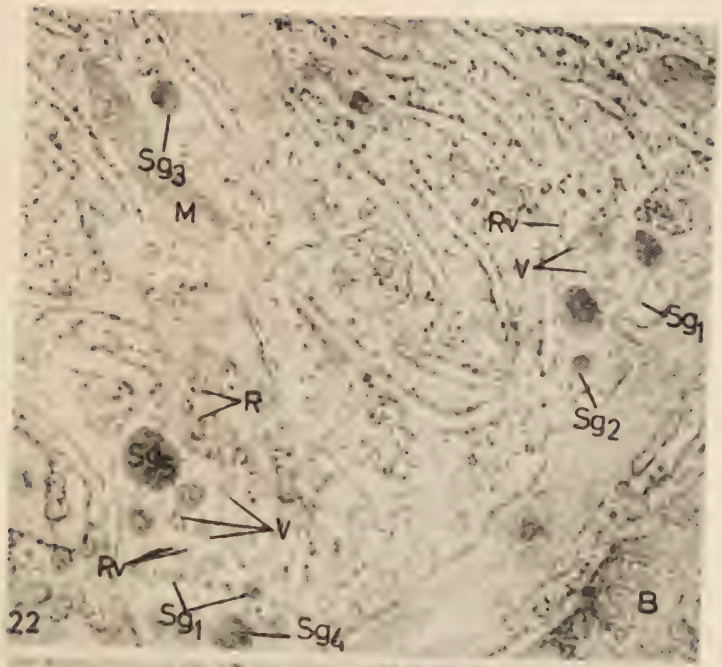

C
ER
Sg
ER
ER
M

Abb. 22. In dem äußeren Teil einer durch Pilokarpin gereizten Drüsenzelle liegen neben kompakten Ribosomen (R) auch vesikuläre Strukturen. Diese haben entweder die Größe von Ribosomen (Rv) oder sind größer (V). Sie liegen meist in unmittelbarer Nähe kleiner und größerer Sekretgranula (Sg_2 - Sg_5) und Vesikeln, die mit osmiophiler Substanz gefüllt sind (Sg_1). An solchen Orten sind kompakte Ribosomen selten. Die Ergastoplasmazisternen sind teilweise parallel angeordnet, teilweise ungeodnet und zerrissen. Mitochondrien (M) sind zahlreich vorhanden. Im rechten unteren Teil des Bildes ist eine Blutkapillare mit einer Blutzelle (B) zu sehen. Formol, OsO_4, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 60 000fach

Abb. 23. Die in einer pilokarpingereizten StK - Zelle parallel angeordneten ER - Zisternen zeigen erste Auflösungserscheinungen: Von einigen Zisternen lösen sich Vakuolen (Pfeil), wobei die Kontinuität der Stränge verloren geht. In der Mitte des Bildes ist ein Sekretgranulum (Sg), im linken unteren Teil ein Golgi - Apparat (G) zu sehen. OsO_4, Araldit, Bleihydroxid, Vergr. 45 000fach


Sg3
M
Rv
V
Sg1
Sg2
R
Sg5
V
Rv
Sg1
Sg4
B
22

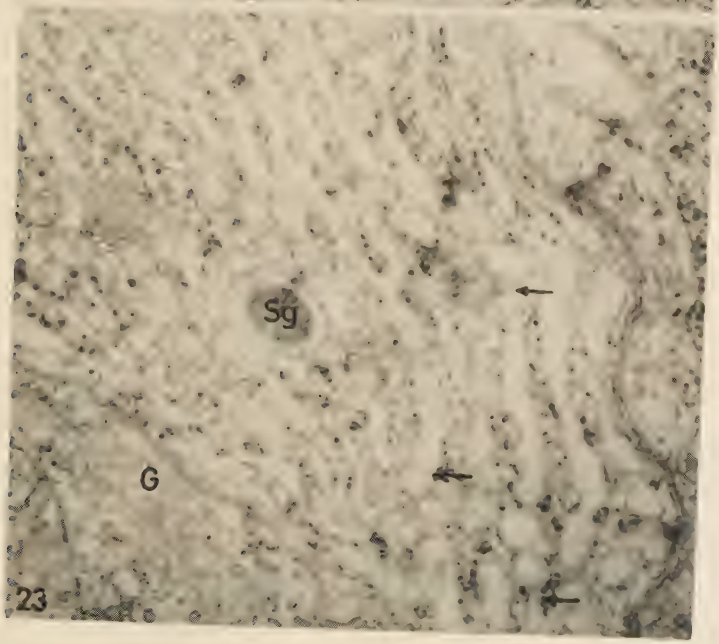

Sg
G
23

Abb. 24. Ansammlungen 160 A gro er Partikel liegen inselartig im äu eren Teil einer pilokarpingereizten Zelle. In unmittelbarer Nähe dazu liegt eine Fülle von Mitochondrien (M). Einige der Partikel haben sich kettenhartig (k), andere haufenförmig (h) zusammengelagert. An einer Stelle bilden die Partikel durch Zusammenlagern eine amorphe Masse (Pfeil), in der einzelne Partikel nicht mehr zu erkennen sind. Formol, OsO_4, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 60 000fach

Abb. 25. Innerhalb zweier Inseln haben sich 160 A große Partikel teilweise kettenartig (k), teilweise haufenförmig (h) zusammengelagert. An einigen Stellen werden amorphe Substanzen (Sg1) teilweise von einer Membran (Pfeil) umgeben. Sie unterscheiden sich in ihrer elektronenoptischen Dichte nicht von Sekretgranula (Sg2). Vereinzelt lassen sich vesikuläre Strukturen erkennen. Auf dem Bild sieht man ferner eine Anzahl von Mitochondrien (M). Formol, OsO_4, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 60 000fach

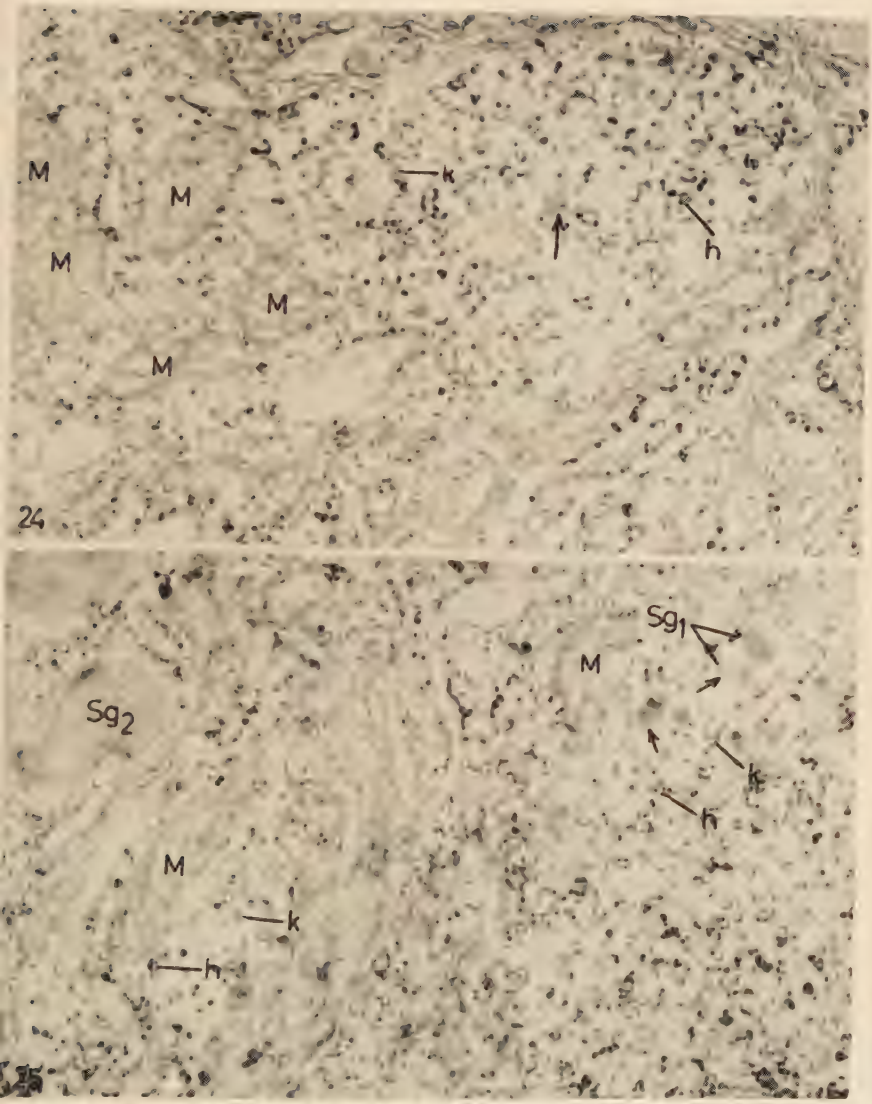

M
M
M
M
M
k
h
24
Sg1
M
Sg2
k
h
M
k
h

Abb. 26. Zwischen zwei Zellgrenzmembranen (ZM) liegt ein Sekretgranulum, das sich möglicherweise in Auflösung befindet. Formol, OsO_4, Vestopal, Bleihydroxid, Vergr. 60 000fach

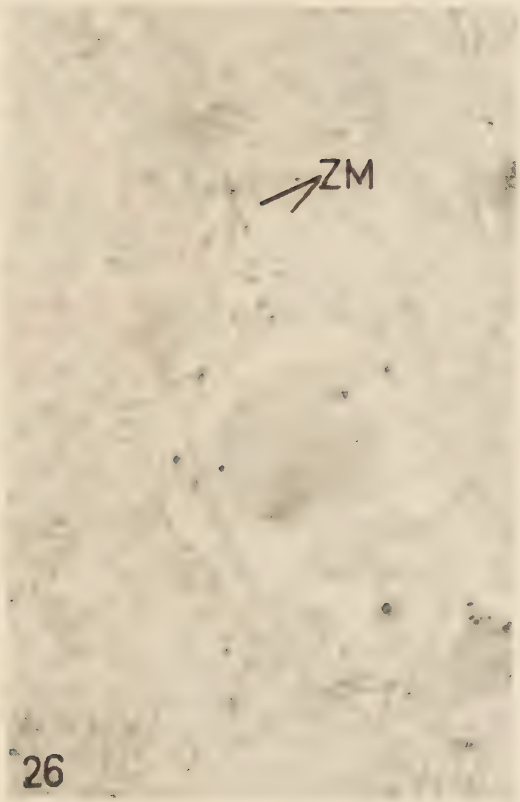
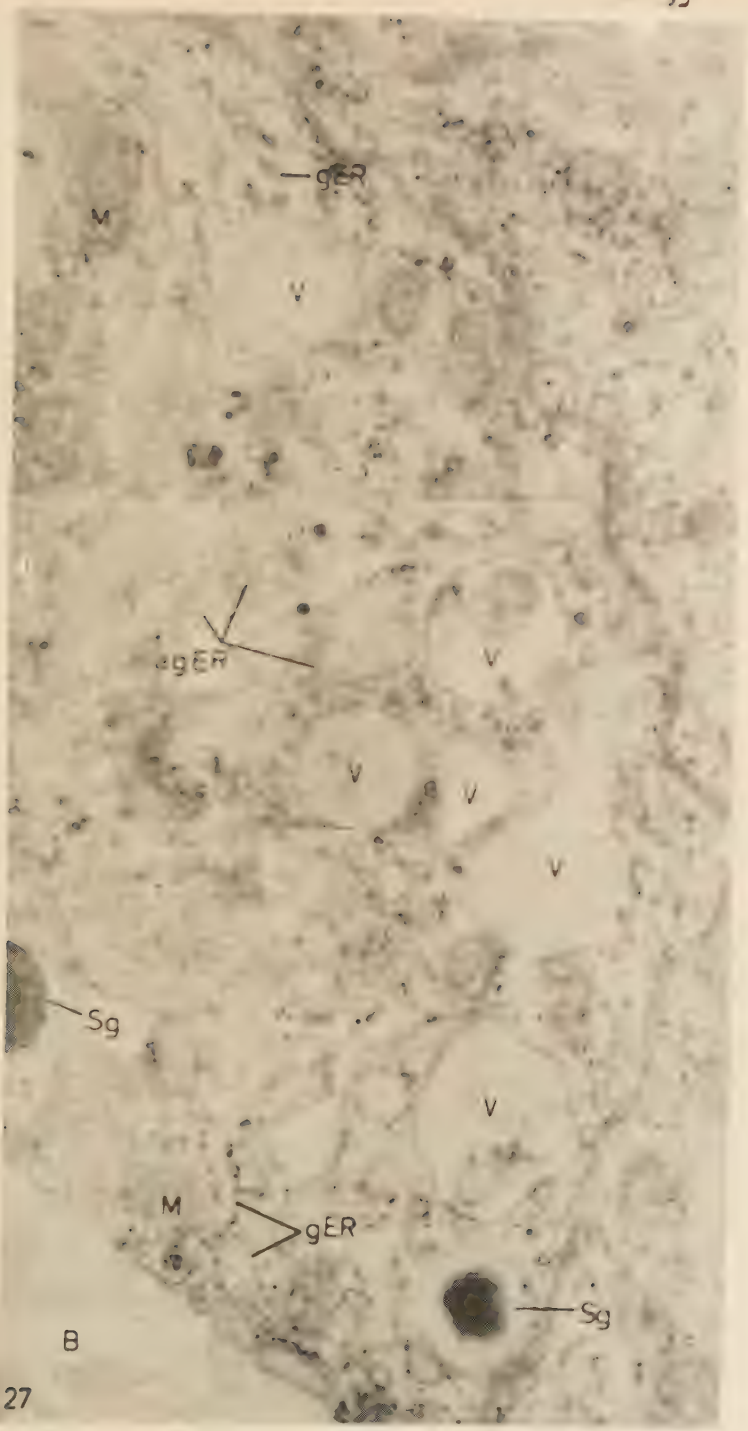

ZM
26

Abb. 27. Eine durch Pilokarpin gereizte StK - Zelle enthält eine Anzahl großer leerer Vakuolen (V), vereinzelte Sekretgranula (Sg) und wenige Mitochondrien (M). Vermutlich hat diese Zelle gerade ihr Sekret geschüttet. Man erkennt nur wenig granuläres (gER), dagegen viel agranuläres endoplasmatisches Retikulum (agER). In der linken unteren Ecke des Bildes ist eine Blutkapillare (B) zu sehen. OsO_4, Araldit, Bleihydroxid, Vergr. 60 000fach



27

Abb. 28. Der Ausschnitt einer mit Pilokarpin gereizten StK - Zelle, die nach Formolfixierung mit Ribonuklease behandelt wurde, zeigt, daß die frei im Cytoplasma liegenden und an ER - Membranen haftenden Ribosomen zu vesikulären Strukturen (Rv) abgebaut sind. Die etwa 160 A großen Partikel einer "Insel" erscheinen dagegen unverändert. Durch die Inkubation bei 37°C sind die Mitochondrien (M) und Ergastoplasmazisternen (ER) etwas aufgequollen. Die Sekretgranula (Sg) haben sich nicht verändert. Formol, Ribonuklease, OsO_4, Araldit, Bleihydroxid, Vergr. 100 000fach

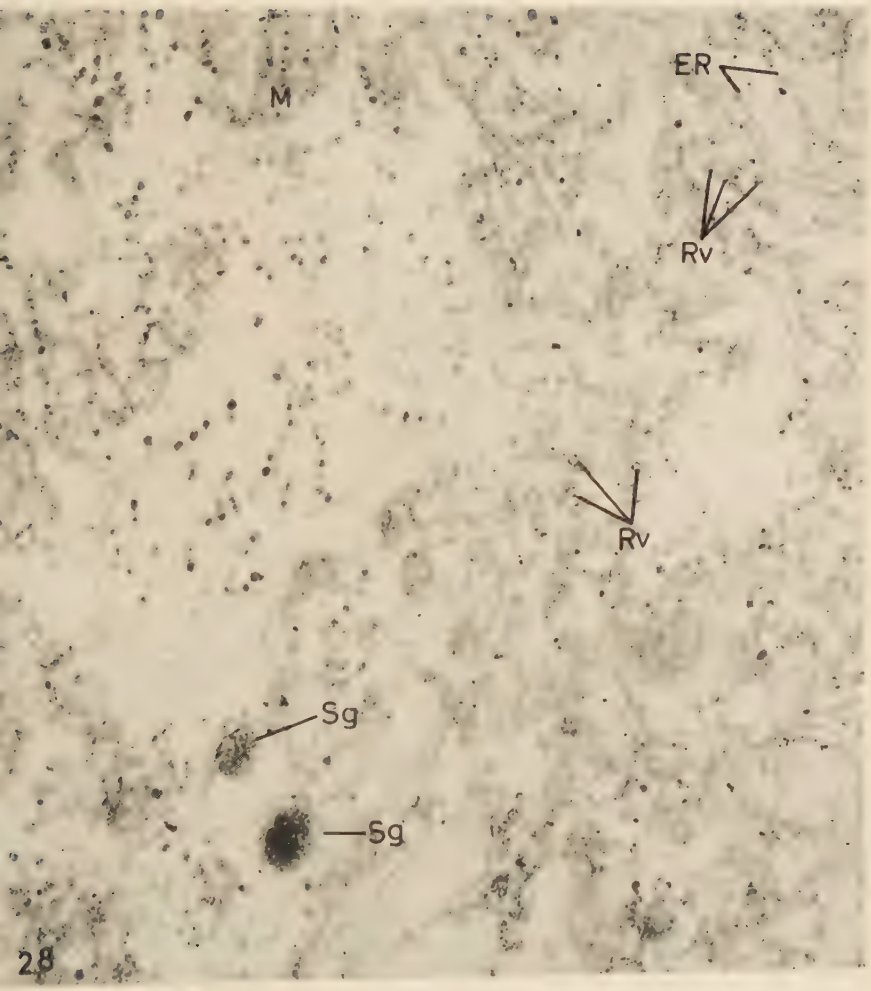
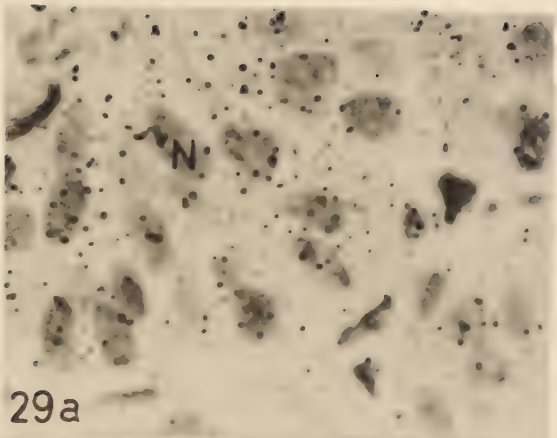
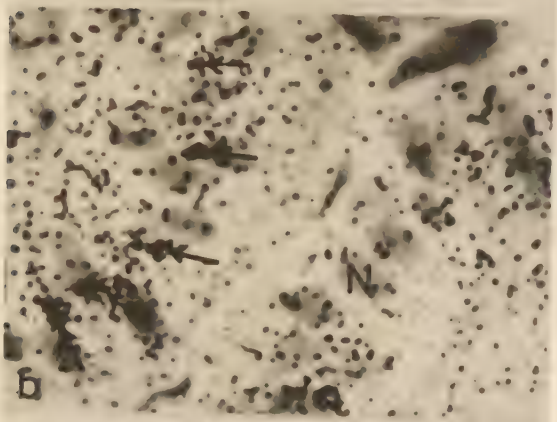

M
ER
Rv
Rv
Sg
Sg
28

Abb. 29 a - c. Die Autoradiogramme von Stanniusschen Körperchen nach H^3 - Leucin - Injektion zeigen innerhalb der Zellen eine Wanderung von aktivem Material: a) 45 Min. nach der Injektion liegen die Silberkörner diffus über den Zellen verteilt. Sie kondensieren b) nach 2 Std. in der Nähe des Kernes (N) und c) nach 7 Std. über dem äußeren Teil der Zelle. Die Expositionsdauer der Präparate betrug 12 Tage. Auffällige Ansammlungen von Silberkörnern sind durch einen Pfeil markiert. OsO_4, Paraffin, H. E., Vergr. 1 300fach



29a



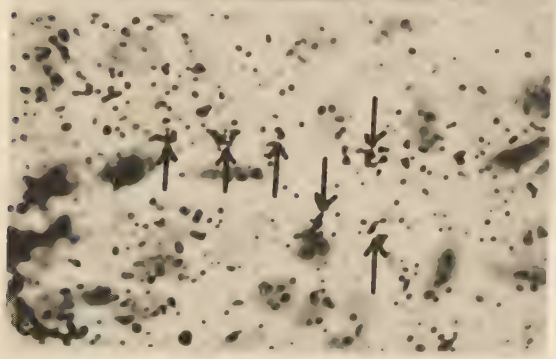
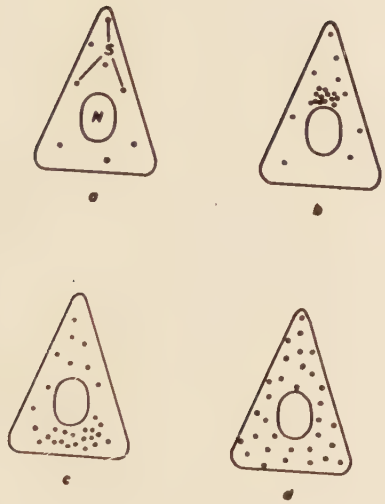


Abb. 30. Die Wanderung von radioaktivem Material in den Zellen der StK nach Injektion von H^3 - Leucin ist im Schema dargestellt. Dieses beschreibt im einzelnen die qualitative Silberkornverteilung a) 45 Min., b) 90 Min. - 4 Std., c) 7 Std. und d) 12 Std. nach der H^3 - Leucin - Injektion. Es läßt sich erkennen, daß das radioaktive Material zunächst diffus über der Zelle verteilt ist, sich später in Kernnähe und wiederum später im äußeren Teil der Zelle ansammelt. Nach weiteren Stunden ist radioaktives Material wieder diffus in der Zelle verteilt.

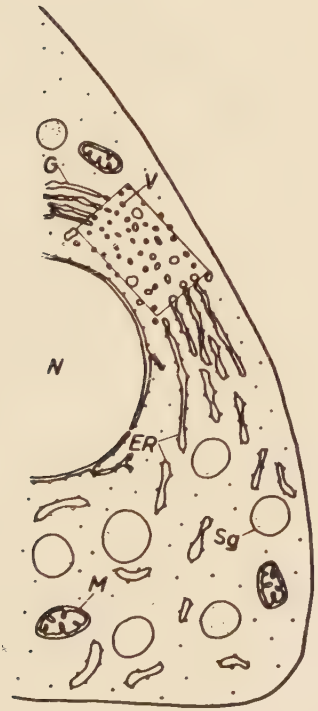


30

Abb. 31 a, b. Die elektronenmikroskopisch untersuchten Autoradiogramme von StK nach H^3 - Leucin - Injektion zeigen, daß die meisten Silberkörner über Vesikelfelder in der Nähe von Ergastoplasmazisternen und Golgi - Apparat (Pfeil), wenige Silberkörner über Sekretgranula (Sg), Kern (N) und anderen Zellorganellen liegen. Vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Töten des Tieres vergingen 2 Std. Die Expositionsdauer der Präparate betrug 18 Tage. Die Emulsion der Präparate wurde nicht heruntergelöst. OsO_4, Araldit, Vergr. a) 10 000fach, b) 15 000fach

N
31a
N
N
b

Abb. 32. Das Schema veranschaulicht das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchung von StK nach H^3 - Leucin - Injektion: 76% der Silberkörner liegen über Vesikeln (V) in der Nähe von Golgi - Apparat (G) und ER - Zisternen (ER) (Rechteck). In das Schema sind ferner der Kern (N), Mitochondrien (M) und Sekretgranula (Sg) eingezeichnet.



32

Abb. 33. Die Autoradiogramme von Stanniusschen Körperchen nach H^3 - Leucin - Injektion a) eines ungereizten, b) eines durch Pilokarpin gereizten Aales zeigen, daß die Silberkorndichte über dem gereizten Organ wesentlich höher ist als über dem ungereizten. Vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Töten der Tiere vergingen 90 Min.. Die Expositionsdauer der Präparate betrug 12 Tage. OsO_4, Paraffin, Hämatoxylin, Vergr. 1 300fach

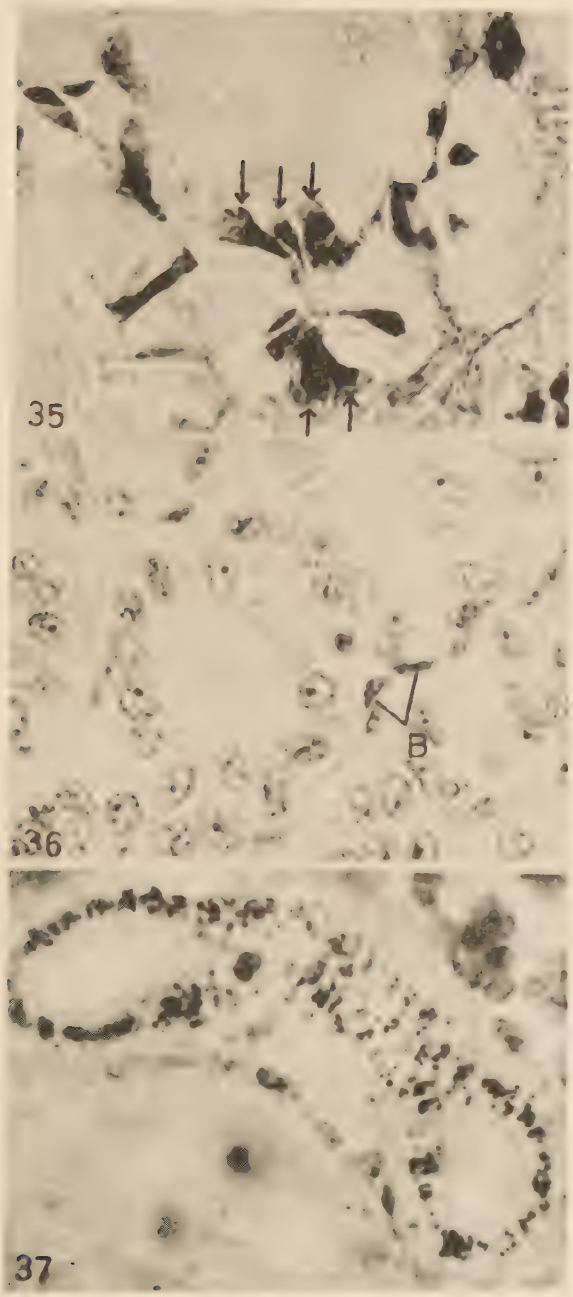
Abb. 34. Die Autoradiogramme von Stanniusschen Körperchen nach H^3 - Cytidin - Injektion a) eines ungereizten, b) eines durch Pilokarpin gereizten Aales zeigen, daß die Silberkorndichte über dem gereizten Organ wesentlich geringer ist als über dem ungereizten. Vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Töten der Tiere vergingen 90 Min.. Die Expositionsdauer der Präparate betrug 12 Tage. OsO_4, Paraffin, Hämatoxylin, Vergr. 1 300fach

346

Abb. 35. Auf den Baker - Test reagieren wenige Zellen ungereizter Stk positiv (dunkle Zellen), die meisten negativ (helle Zellen). In den positiv reagierenden Zellen ist der äußere Teil (Pfeil) schwächer gefärbt als der innere. Calcium - Formol, Kryostat - Schnitt, saures Haematein, Vergr. 800fach

Abb. 36. Nach Extraktion sämtlicher Lipide durch Pyridin reagieren in den Stanniusschen Körperchen nur noch die Blutzellen (B) positiv auf den Baker - Test. Bouin - Allen, Pyridin, Kryostat - Schnitt, saures Haematein, Vergr. 800fach

Abb. 37. In den mit Pilokarpin behandelten Aalen reagieren die Stanniusschen Körperchen negativ, die Zellen einzelner Nierentubuli (Abb.) dagegen positiv auf den Baker -Test. Calcium - Formol, Kryostat - Schnitt, saures Haematein, Vergr. 800fach


35
B
36
37

L e b e n s l a u f

Am 31. August 1937 wurde ich, Hansjürgen Ristow, als Sohn des Bankbeamten Otto Ristow und seiner Ehefrau Liselotte in Berlin geboren. Ich besuchte von 1943-1945 die 42. Volksschule in Breslau, von 1945-1948 die 19. Volksschule in Berlin-Friedenau, von 1948-1952 die 19. Einheitsschule in Berlin-Schöneberg, von 1952-1954 die Friedrich-Ebert-Schule in Berlin-Wilmersdorf und von 1954-1957 das Walther-Rathenau-Gymnasium in Berlin-Grunewald, an dem ich im Frühjahr 1957 mein Abitur bestand. Mein Studium begann ich im SS 1957 an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Germanistik und an der Deutschen Hochschule für Politik Berlin. Im WS 1957/58 studierte ich an der FU weiterhin Germanistik und begann mein Studium der Biologie. Vom SS 1958 bis zum WS 1963/64 studierte ich in Göttingen Biologie .

Fotodruck Frau Elly HUTH Tübingen